А.Г. Ситников
Л.А. Травина
В.Л. Багирова

ЛАЛ-тест

Современные подходы к определению пирогенности

Москва 1997

Ситников А.Г., Травина Л.А., Багирова В.Л.

ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. – М., 1997. – 96 с.

Книга посвящена актуальной проблеме – контролю пирогенности лекарственных препаратов методом ЛАЛ-теста, то есть контролю содержания бактериальных эндотоксинов. В ней приведен анализ зарубежной литературы последних лет, включая Фармокапеи, описываются биохимические реакции, лежащие в основе этого теста, приводятся методы проведения испытаний, анализируется опыт применения ЛАЛ-теста в фармацевтической промышленности и клинической практике.

Книга предназначена для работников контрольно-аналитических лабораторий, отделов технического контроля, а также сотрудников научно-исследовательских институтов, занимающихся контролем качества лекарственных препаратов.

© Ситников А.Г., Травина Л.А., Багирова В.Л.

Оглавление

Введение……………………………………………………………………………………3

1. Эндотоксины грамотрицательных бактерий - свойства, методы тестирования….. 5

2. ЛАЛ-тест, история возникновения и методы получения ЛАЛ-реагента…………11

3. Механизм реакции гелирования лизата амебоцитов………………………………..19

4. Стандарты эндотоксина……………………………………………………………… 33

5. Методы и условия проведения ЛАЛ-теста…………………………………………..41

5.1. Методы проведения ЛАЛ-теста……………………………………………………41

5.2. Условия проведения ЛАЛ-теста, ложноположительные и ложноотрицательные результаты…………………………………………………………51

6. Области применения ЛАЛ-теста……………………………………………………..59

6.1. Применение ЛАЛ-теста в фармацевтической промышленности……………… 59

6.2. Применение ЛАЛ-теста в клинической практике…………………………….. 63

6.3. Расширение сферы применения ЛАЛ-теста………………………………………68

Заключение…………………………………………………………………………………73

Приложение 1………………………………………………………………………………77

Приложение 2………………………………………………………………………………93

ВВЕДЕНИЕ

ЛАЛ-тест для определения пирогенности лекарственных препаратов является активно развивающимся в настоящее время способом контроля качества лекарств, воды для инъекций и т.д. Он может быть использован и в медицине для ранней диагностики заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями, и в некоторых других областях, где необходимо быстрое обнаружение грамотрицательных бактерий или их эндотоксинов. В основе этого теста лежит способность лизата амебоцитов (клеток крови) мечехвоста специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий (липополисахаридами, ЛПС). В результате реакции эндотоксина и лизата происходит помутнение прозрачной реакционной смеси или образование твердого геля, что и служит индикатором присутствия эндотоксина. Реакция проста и не требует много времени, ответ может быть получен через 30–60 мин. Тест высокоспецифичен по отношению к эндотоксинам грамотрицательных бактерий. Чувствительность его во много раз превышает чувствительность фармакопейного теста на кроликах. Сырьем для производства ЛАЛ-реагента служит кровь мечехвостов – морских животных, обитающих у берегов Северной Америки, Японии, Китая, Вьетнама, Индии. Готовый препарат представляет собой сублимационно высушенный лизат клеток крови (амебоцитов), который после разведения его апирогенной водой готов к использованию.

Реакция лизата амебоцитов с эндотоксином была открыта в США в 1964 г., где и был налажен выпуск первых коммерческих препаратов. Поскольку первые исследования были проведены на мечехвостах вида Limulus polyphemus, препарат, полученный из их крови, был назван Лизат амебоцитов Лимулус (Limulus amebocyte lysate) или сокращенно ЛАЛ-реактив и соответственно ЛАЛ-тест. Преимущества этого теста – высокая чувствительность, простота выполнения, надежность,

воспроизводимость, возможность получения количественного ответа. К несомненным преимуществам ЛАЛ-теста относится возможность анализировать в короткий срок (1–2 ч) большое число образцов. При массовом использовании ЛАЛ-тест, безусловно, дешевле теста на кроликах. Кроме того, область применения этого метода по сравнению с определением на кроликах значительно шире: создается возможность для определения пирогенности лекарств, которые нельзя было испытывать на кроликах – короткоживущих изотопов, препаратов седативного действия и др.; проводится определение эндотоксинов в крови и других биологических жидкостях организма, что расширяет возможности ранней диагностики инфекционных заболеваний, вызываемых грамотрицательными микроорганизмами; анализируется чистота медицинских аппаратов, соприкасающихся с кровью пациента; проводится постадийный контроль содержания ЛПС в производстве инъекционных препаратов. Кроме того, ЛАЛ-тест используется в электронной промышленности для анализа чистоты технологической воды.

В настоящее время ЛАЛ-тест узаконен фармакопеями США, Италии, Китая, Европейской фармакопеей и др. У нас в стране проведена работа по составлению проекта общей фармакопейной статьи по альтернативному методу определения пирогенности с помощью ЛАЛ-теста.

В предлагаемом обзоре затронуты вопросы, связанные с природой пирогенности, структурой и физико-химическими свойствами бактериальных эндотоксинов. Подробно рассмотрены механизмы реакции гелирования лизата амебоцитов и методы получения ЛАЛ-реактива. Особое внимание уделено способам определения пирогенности с помощью ЛАЛ-реактива.

Мы надеемся, что данный обзор поможет внедрению ЛАЛ-теста для анализа эндотоксинов как в лекарственных препаратах, так и для постадийного контроля качества в процессе приготовления различных лекарственных форм в аптеках и на фармацевтических производствах.

1. ЭНДОТОКСИНЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ – СВОЙСТВА, МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Пирогенную реакцию – повышение температуры тела способны вызывать вещества самой различной природы и разного происхождения. Причиной такой реакции так часто являются эндотоксины грамотрицательных бактерий, что термин "пирогены" и "эндотоксины" употребляются как синонимы, хотя и не все пирогены эндотоксины.

Термин "эндотоксины" предполагает внутреннее происхождение этих токсинов в отличие от "экзотоксинов" – токсинов, выделяемых бактериями в процессе жизнедеятельности в окружающую среду. Считалось, что эндотоксины освобождаются только после разрушения бактерии и остаются во внешней среде после ее гибели. На самом деле эндотоксины являются частью наружной стенки грамотрицательных бактерий и действительно оказываются во внешней среде после ее разрушения, в сущности представляя собой осколки клеточной стенки. Впрочем и живые бактерии постоянно выделяют эндотоксины, которые отрываются от наружной стенки. Эндотоксины устойчивы к нагреванию и легко переносят процесс стерилизации, например автоклавирование, при котором разрушаются бактерии, а фрагменты клеточных стенок этих бактерий, т.е. эндотоксины, сохраняют свои свойства. Таким образом, стерилизация не может гарантировать отсутствия эндотоксинов, для разрушения которых используются другие способы. Сам же процесс разрушения эндотоксинов называется депирогенизацией, при этом, как правило, имеется ввиду именно разрушение эндотоксинов, а не других пирогенов.

Неочищенный эндотоксин состоит из липидной, полисахаридной и белковой частей. Очищенный же эндотоксин не содержит белка, поэтому

эндотоксины грамотрицательных бактерий называют еще липополисахаридами (ЛПС), подчеркивая тем самым их химическую природу.

Молекула ЛПС состоит из трех частей, каждая из которых проявляет свои уникальные свойства. Это – Липид А, О-специфическая цепь и полисахаридное ядро – кор. Липид А состоит из дисахарида, фосфата и жирных кислот. Центральную часть молекулы составляет олигосахаридное ядро (кор), которое служит соединительным мостом между Липидом А и О-специфической цепью. Многие сахара и их производные, входящие в О-специфическую цепь, являются уникальными и их различные комбинации определяют огромное количество серотипов грамотрицательных бактерий.

Наиболее заметную биологическую активность проявляет Липид А. Отделенный от полисахаридного участка он сохраняет свою биологическую активность, хотя и несколько уменьшенную по сравнению с целым ЛПС.

Существует множество способов устранения эндотоксинов, которые могут быть применены как для растворов, так и для устранения эндотоксинов с твердых поверхностей.

Наиболее надежным способом устранения эндотоксинов является сухожаровая обработка. Это самый простой способ депирогенизации стеклянной посуды и металлического инструмента. Эффективность обработки напрямую зависит от времени обработки и температуры. Нормой считается нагрев до 240–250 °С не менее 30 мин. Температура ниже 175 °С может оказаться неэффективной, и время экспозиции уже не будет иметь никакого значения [1].

Эндотоксины не разрушаются во время обычного цикла автоклавирования [1, 2], хотя автоклавирование продолжительное время в щелочной или кислой среде или в присутствии перекиси водорода способно значительно снизить концентрацию эндотоксина [1].

Хорошим способом устранения эндотоксинов является ультрафильтрация, однако необходимо помнить, что молекулы ЛПС могут образовывать различные агрегаты и структуры, природа которых зависит от характера раствора, в котором они находятся. В присутствии ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} ЛПС образуют довольно крупные агрегаты диаметром более 0,1 мкм. Такие крупные агрегаты, хотя и проходят через фильтр с размером пор 0,22 мкм, но задерживаются на фильтре с размером пор 0,025 мкм.

Однако, если двухвалентные ионы удалить из раствора каким-либо комплексообразующим агентом, например ЭДТА, агрегаты разрушаются

и в таком растворе ЛПС присутствует в виде мелких частиц. В отдельных случаях ЛПС может присутствовать в виде мелких субъединиц с М.м. около 20 000, которые могут быть удалены ультрафильтрацией через фильтр с номинальным пределом разделения по М.м. 10 000 [3]. В большинстве случаев ЛПС присутствует в виде крупных агрегатов, которые задерживаются на фильтре с номинальным пределом разделения 100 000. Таким образом, с помощью ультрафильтрации можно успешно очищать низкомолекулярные растворы без потерь активного вещества.

Наиболее эффективным способом депирогенизации воды по прежнему является дистилляция. Так же очень эффективна очистка воды путем обратного осмоса. Обратноосмотическая мембрана с размером пор 10 Å дает практически полную гарантию очистки от эндотоксинов, которые не способны пройти через ее поры. Именно поэтому обратный осмос наряду с дистилляцией принят USP как средство получения воды для инъекций.

Кроме перечисленных способов для инактивации эндотоксинов может быть использовано гидролитическое разложение молекулы ЛПС при нагревании в щелочной или кислой среде или обработкой перекисью водорода. Эффективность разрушения прямо зависит от концентрации, температуры и времени.

Наконец, эндотоксины могут адсорбироваться разными веществами, например активированным углем или алифатическими полимерами – полиэтиленом, полипропиленом [4].

Эндотоксины проявляют широкий спектр биологической активности. Попадая в кровь со стерильными, но не апирогенными лекарствами, эндотоксины вызывают лихорадочный приступ – пирогенную реакцию. Способность эндотоксинов вызывать повышение температуры тела – первое из зарегистрированных и наиболее наглядное из свойств эндотоксинов. На самом деле они приводят к серьезным биохимическим сдвигам, вплоть до летального исхода в случаях высоких концентраций.

Высокая устойчивость эндотоксинов, их высокая биологическая активность, большая вероятность их присутствия в готовых инъекционных лекарственных формах из-за весьма возможного попадания бактерий с сырьем, водой, либо из воздуха, а также те серьезные последствия, которые вызываются попаданием эндотоксинов в кровь, делают необходимым обязательный контроль присутствия эндотоксинов в готовом лекарственном препарате.

Главным способом определения пирогенности долгое время был тест на кроликах. В этом тесте исследуется реакция кроликов на введение

им в кровь испытуемого раствора. Повышение температуры тела животного выше допустимой нормы указывает на наличие пирогенных примесей. Этот тест был впервые узаконен Фармакопеей США XII издания в 1942 г. Этому в немалой степени способствовала высокая потребность в инъекционных лекарствах, в том числе в инфузионных растворах во время войны.

Температурную реакцию, сходную с реакцией человека, пирогены вызывают и у обезьян, лошадей, собак, кошек, крыс и мышей. Однако температурная реакция у крыс, морских свинок, мышей нерегулярная и непредсказуемая, что делает их непригодными для анализа.

Наиболее подходящими кандидатами на роль тест-животных оказались кролики и собаки. У кроликов механизм терморегуляции более гибкий и они могут давать ложноположительные результаты. Таким образом, отрицательный результат – отсутствие пирогенов в случае кроликов – более надежен, чем положительный. У собак же более стабильная терморегуляция, но они менее чувствительны к пирогенам, чем кролики. Зато положительная реакция у собак более четкая, с ярко выраженными побочными явлениями. Это означает, что положительный результат для собак более надежен, чем отрицательный. Таким образом, кролики оказались более подходящими животными для теста, указывающего на отсутствие пирогенов, собаки же лучше подходят для теста, указывающего на наличие пирогенов [5].

Кролики оказались очень удачным выбором, хотя бы по тому, что за 50 лет существования тест не претерпел серьезных изменений.

Однако сравнительно недавно появился тест, способный регистрировать наличие эндотоксинов. Речь идет о ЛАЛ-тесте или Limulus тесте, представляющем собой реакцию in vitro между эндотоксинами и ЛАЛ-реагентом. В отличие от теста на кроликах, в данном случае речь идет не о пирогенах вообще, а именно об эндотоксинах грамотрицательных бактерий. Именно с эндотоксинами, и только с ними, способен специфически реагировать лизат амебоцитов Limulus (ЛАЛ-реагент). Впервые этот тест был включен в Фармакопею США XX издания в 1985 г. и получил название “Определение бактериальных эндотоксинов”. Подробному описанию этого перспективного метода и посвящены остальные части этого обзора.

Список литературы

1. Weary M. // Pyrogens: endotoxins, LAL-testing, and depyrogenation. Ed. F.C. Pearson. – Marsel Dekker. Inc. N.-Y., 1985. – P. 203–218.
2. Dressel H., Jacker H. J. // J. Pharm. Belg. – 1979. – Vol. 34. – N 3. – P. 161–163.
3. Good C.M., Lane H.E. // Bull. Parent. Drug. Assoc. – 1977. – Vol. 31. – N 3. – P. 116–120.
4. Novitsky T.J., Schmidt-Gengenbach J., Remillard J.F. // J. Parent. Sci. Technol – 1986. – Vol. 40. – N 6. – P. 284–286.
5. Weary M. // Pyrogens: endotoxins, LAL-testing, and depyrogenation. Ed. F.C. Pearson. – Marsel Dekker. Inc. N.-Y., 1985. – P. 104–118.

2. ЛАЛ-ТЕСТ, ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛАЛ-РЕАКТИВА

Началом разработки теста можно считать работу Ф.Б.Банга [1], в которой он опубликовал результаты исследований реакции мечехвостов Limulus polyphemus на введение им в кровь морских бактерий. После введения бактерий большинство животных погибало от обширного внутрисосудистого свертывания крови. Такое свертывание вызывали не только живые бактерии, но и их "термостабильный экстракт" – убитые кипячением бактерии. Исследования этого феномена были продолжены Ф.Б. Бангом через 8 лет совместно с Дж. Левиным. В 1962 году они опубликовали статьи, которые по праву считаются основой ЛАЛ-теста [2, 3]. В этих работах авторы указывали, что реакцию свертывания вызывает эндотоксин грамотрицательных бактерий, в отсутствии эндотоксина свертывания не происходит. Для инициации реакций нужны минимальные количества эндотоксина. От концентрации эндотоксина зависит скорость реакции. Кинетика реакции предполагает наличие каскада ферментов, последовательная активация которых переводит растворимый способный свертываться белок в нерастворимый гель. Реакция свертывания в общих чертах напоминает свертывание крови у млекопитающих, но (в отличие от последних) у мечехвоста в свертывании не принимают участия белки плазмы крови, а участвуют только белки, находящиеся в клетках крови – амебоцитах [2, 3]. Благодаря этому реакция гелирования крови под действием эндотоксина легко может быть воспроизведена in vitro. Для этого амебоциты надо отделить от плазмы и лизировать. Высокая чувствительность и специфичность к эндотоксинам грамотрицательных бактерий делает лизат амебоцитов надежным средством их обнаружения [4].

Мечехвосты – древнейшие морские животные. Современные мечехвосты мало отличаются от животных, чьи отпечатки обнаруживают в отложениях Юрского и Триасского периодов. В современной фауне известно 4 сохранившихся вида мечехвостов. Вид Limulus polyphemus встречается у берегов Северной и Центральной Америки. Три вида: Tachypleus tridentatus, Tachypleus gigas и Carcinoscorpius rotundicauda живут у берегов юго-восточной Азии. Tachypleus gigas и Carcinoscorpius rotundicauda встречаются в Бенгальском заливе, у островов Индонезии и у берегов Борнео, где их ареалы перекрываются ареалом Tachypleus tridentatus. Этот вид распространен от Филиппинских островов вдоль берегов Вьетнама и Китая до юга Японии [5].

Кровь, точнее гемолимфа, мечехвостов имеет голубую окраску, которую ей придает пигмент гемоцианин, выполняющий кислородотранспортную функцию. В крови содержится только один тип клеток – амебоциты или гранулярные гемоциты [6]. Свертывание крови происходит в два этапа: первый – слипание или агглютинация клеток; второй – гелирование гемолимфы [7, 8]. Агглютинация происходит спонтанно за 16–20 с, и в отсутствие ингибиторов по истечении 5 мин более 98 % клеток агглютинированы [7, 8]. На первом этапе происходит разрушение клеток и высвобождение в плазму различных компонентов коагуляционной системы – способного свертываться белка (коагулогена) и ферментов [3, 4]. После этого происходит свертывание крови, в результате чего образуется гель. Время гелирования, измеряемое по первому появлению геля, колеблется от 24 до 55 с [7]. Для активации процесса коагуляции требуются минимальные количества эндотоксинов грамотрицательных бактерий. В отсутствии эндотоксинов коагуляции не происходит [2]. Плазма крови мечехвостов не способна свертываться, так как она не содержит факторов коагуляции [4, 5, 9].

Надо отметить, что потенциальная ценность реакции стала понятной почти сразу. Действительно, система гемостаза мечехвостов (благодаря своей древности и некоторой примитивности устройства) представляет собой уникальную биологическую систему, сочетающую в себе высокую чувствительность к бактериям и их токсинам с простотой. Очень важным оказалось то, что все компоненты этой системы локализованы в одном единственном типе клеток крови. Поэтому выделение этой системы свертывания теоретически сводится к элементарнейшим операциям. Однако подбор подходящего антикоагулянта, препятствующего слипанию амебоцитов при отделении их от плазмы, оказался непростой задачей. Дело в том, что методы сбора и разделения крови, приемлемые для

млекопитающих – использование гепарина, удаление ионов кальция, охлаждение являются совершенно неэффективными в применении к мечехвостам [10]. В конце концов подходящий антикоагулянт был найден, им оказался ингибитор сульфгидрильных групп – N-этилмалеимид [11], возможно, сульфгидрильные группы принимают какое-то участие в процессе агглютинации амебоцитов. Так или иначе N-этилмалеимид (НЭМ) оказался эффективным антикоагулянтом и в дальнейшем для сбора крови мечехвостов стали использовать в основном его.

Причины высокой чувствительности и специфичности реакции гелирования, которая вызывается только эндотоксинами грамотрицательных бактерий, является предметом серьезных исследований и научных споров. Однако несмотря на интенсивное изучение системы коагуляции мечехвостов, вызванное широким распространением ЛАЛ-теста, окончательное объяснение этой высокой чувствительности еще не найдено. Считается, что эта реакция является древним и наиболее примитивным механизмом защиты животных от повреждений и вторжения патогенных бактерий. Примитивность и простота этой системы объясняется древностью этого вида животных, которые практически не изменялись последние 250–300 млн лет. Некоторые ученые считают эту систему коагуляции прообразом систем свертывания других, более молодых в эволюционном отношении животных, таких, например, как млекопитающие, у которых система свертывания включает множество факторов не только тромбоцитарных, но и плазменных. У мечехвостов все факторы свертывания сосредоточены в амебоцитах. Кроме того, амебоциты могут проявлять и бактерицидную активность [4, 6]. Исключительная же чувствительность к эндотоксинам связана с высокой концентрацией грамотрицательных бактерий в морской воде, особенно в придонном ее слое – среде обитания мечехвостов. Отмечается, например, что в 1 мл морской воды их содержится более 1 млн, а в 1 г песка прибрежной зоны – около 1 млрд [12]. Поэтому любое повреждение покровов тела приводит к контакту клеток крови с бактериями, которые и запускают реакцию свертывания. Образовавшийся сгусток крови препятствует дальнейшей ее потере, закупоривает место повреждения, а главное, иммобилизует бактерии, предохраняя таким образом животное от заражения [4, 6, 12]. Таким образом, система коагуляции мечехвоста представляет собой пример защитного механизма древних животных от вторжения патогенных для них микроорганизмов. И хотя эта система примитивнее аналогичных систем более молодых групп животных, она исправно служит мечехвостам на протяжении последних 250 млн лет.

Интересно, что почти сразу после открытия и описания реакции системы свертывания мечехвостов на эндотоксин начались вполне естественные поиски альтернативных и, возможно, более чувствительных источников реакционных систем, способных эффективно реагировать с эндотоксином. Исследования крабов, раков и омаров, которых трудно даже назвать родственниками мечехвостов, ничего обнадеживающего не дали. Отмечалось, что несмотря на некоторое сходство ответа ракообразных на введение эндотоксина, такой надежной и чувствительной системы как у мечехвостов, по всей вероятности, получить не удастся в основном из-за технических сложностей выделения факторов свертывания, среди которых есть, вероятно, и факторы плазмы. Все-таки раки ушли далеко в своем эволюционном развитии от мечехвостов [6].

Есть еще и самые близкие родственники мечехвостов – пауки и скорпионы. Однако у них мало крови, к тому же, если верно утверждение, что такая чувствительность мечехвостов к эндотоксинам связана с условиями жизни, то скорпионы в эту схему плохо вписываются, так как в воздухе значительно меньше бактерий, чем в морской воде.

К началу 70-х годов были отработаны методы получения лизата амебоцитов и способы проведения теста для обнаружения эндотоксина. Тогда наибольший интерес представляла возможность применения ЛАЛ-теста в клинической практике для диагностики заболеваний, вызванных патогенными бактериями, среди которых большое число грамотрицательных. Несколько позже обозначилось другое направление использования ЛАЛ-теста, ставшее впоследствии приоритетным – применение теста для проверки на пирогенность лекарственных препаратов. Возможность использования ЛАЛ-теста как альтернативы тесту на кроликах стимулировала дальнейшее изучение механизма реакции, условий ее протекания, а также развитие методов получения более стабильного и чувствительного лизата. С конца 70-х годов началось промышленное производство препарата для определения пирогенности in vitro.

Промышленный выпуск ЛАЛ-реактива начался в США с конца 70-х годов. Первой фирмой, освоившей его выпуск и производство наборов для определения пирогенности, стала Associates of Cape Cod Inc. Вскоре в США появились и другие производители ЛАЛ-реактива, выпускающие его под разными коммерческими названиями, в разных наборах и для разных целей. В настоящее время препараты для определения пирогенности выпускаются не только в США, где официально зарегистрировано около 10 фирм-производителей ЛАЛ-реактива, но и в

Японии, Китае. Выпускаемые препараты отличаются по чувствительности (созданы препараты с чувствительностью 0,01 э.ед./мл), назначению (существуют препараты, специально предназначенные для определения эндотоксинов в крови). Большая часть выпускаемых ЛАЛ-реактивов предназначена для анализа методом гель-тромб теста, но созданы также реактивы для проведения испытания хромогенным методом и для проведения различных модификаций турбидиметрического метода. Срок годности различных препаратов от 2 до 5 лет. Технология получения ЛАЛ-реактива в общих чертах повторяет предложенную еще 20 лет назад методику [2, 3, 4]. Общая схема его получения представлена на рис. 1.

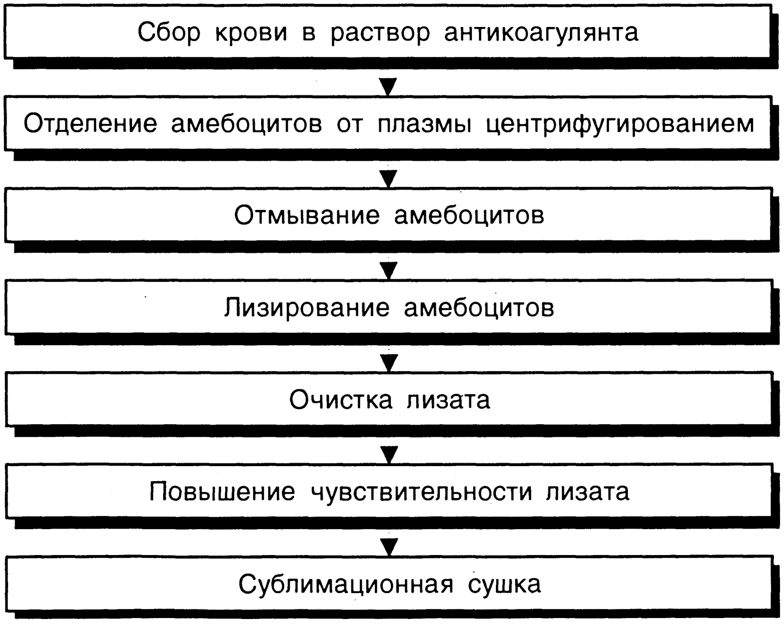

Рис. 1. Общая схема получения ЛАЛ-реактива

Данный обзор не ставит своей целью рассмотрение технологических подробностей получения препарата, поэтому ниже в общих чертах описаны только основные стадии его получения. Получение ЛАЛ-реактива складывается из отделения амебоцитов от плазмы крови и последующего

их разрушения (лизирования), приводящего к высвобождению белкового содержимого (коагулогена, ферментов). Методы сбора крови должны быть как можно более мягкими и, по возможности, предотвращать преждевременное разрушение амебоцитов и выход их содержимого в плазму, чтобы не снизить общий выход реактива. Необходимо отметить также, что эта работа требует строгого соблюдения мер асептики. Все оборудование и растворы должны быть стерильны и апирогенны. Кровь берется прямо из сердца животного введением в него иглы большого диаметра и собирается в силиконированные шприцы или колбы, в которых уже находится антикоагулянт [3, 7, 13]. Как правило это раствор N-этилмалеимида в трис буфере, pH раствора 7,2–7,4. Кроме НЭМ сейчас применяются и другие антикоагулянты, например раствор теобромина или кофеина. Антикоагулянт должен быть подогрет до температуры 40 °С. Соотношение крови и антикоагулянта 1:1 [4, 9, 11, 13]. Единовременно взятый объем крови составляет 50–200 мл в зависимости от массы животного. Однократно можно брать до 30 % объема крови. У мечехвоста объем циркулирующей крови восстанавливается за 3–7 дней. Но для восстановления числа амебоцитов требуется большее время – 3–4 мес. Таким образом, у мечехвостов, содержащихся в аквариуме, можно брать кровь до трех раз в год. Обычно же мечехвосты – доноры. Их вылавливают в море и после взятия крови их выпускают обратно. Считается, что такая операция не приносит вреда животным, но вместе с тем известно, что забор крови один раз в год увеличивает естественную смертность на 10 %. Собранная кровь сразу же центрифугируется для отделения амебоцитов от плазмы. Голубая, содержащая гемоцианин плазма отбрасывается, а осадок амебоцитов отмывается от антикоагулянта, после чего амебоциты лизируются. Методы лизирования применяются самые различные: осмотический лизис дистиллированной водой, лизирование ультразвуком, замораживание–размораживание. После лизирования фрагменты клеток осаждают центрифугированием. Супернатант представляет собой сырой лизат амебоцитов.

Этот сырой лизат уже можно использовать в качестве тест-реактива для обнаружения бактериальных эндотоксинов. Однако серьезным недостатком является значительное колебание чувствительности к эндотоксинам, связанное как с индивидуальными особенностями мечехвостов, так и зависящее от времени года. Как правило, препарат, приготовленный из крови, взятой в зимние месяцы, значительно уступает препаратам, приготовленным летом. Это различие объясняют наличием

в крови (амебоцитах) мечехвоста естественного ингибитора свертывания, концентрация которого зимой увеличивается [14]. Этот ингибитор необходимо удалить, для чего используются самые различные методы, среди которых экстракция органическим растворителем (наиболее эффективным признан хлороформ), смесью растворителей, путем изменения pH экстракта, и наконец, путем хроматографического отделения ингибитора от лизата. Кроме этого для повышения чувствительности к эндотоксинам в лизат вводят двухвалентные катионы: Ca^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}. Такая обработка позволяет увеличить чувствительность лизата более чем в 100 раз [14]. Вообще говоря именно этот этап производства ЛАЛ-реактива наиболее сложен и разнообразен по методикам, что связано со стремлением каждой фирмы-производителя получить более чувствительный препарат и одновременно заявить свой собственный, отличный от конкурентов способ его производства.

Наконец, заключительный этап приготовления лизата включает его сублимационную сушку. Эта процедура значительно увеличивает его стабильность. Высушенный лизат может храниться в запечатанных флаконах при температуре от -18 °С до 4 °С в течение нескольких лет.

В странах, производящих ЛАЛ-реактив, организован государственный контроль его качества. Так, в США надзор за производителями ЛАЛ-реактива осуществляет Bureau of Biologics (BoB), входящее в состав FDA, куда фирмы-производители направляют образцы каждой серии препарата. В BoB контролируется активность, содержание влаги и стерильность образцов. При соответствии обнаруженной активности, заявленной на этикетке, дается разрешение на реализацию этой серии.

Список литературы

1. Band F.B. // Bull. John. Horkins Hosp. – 1956. – Vol. 98. – N 5. – P. 325–337.
2. Levin J., Bang F.B. // Bull. John Horkins Hosp. – 1964. – Vol. 115. – N 3. – P. 265–274.
3. Levin J., Bang F.B. // Bull. John Horkins Hosp. – 1964. – Vol. 115. – N 4. – P. 337–345.
4. Levin J., Bang F.B. // Thromb. Diath. Haemorrh. – 1968. – Vol. 19. – N 1–2. – P. 186–197.
5. Shuster C.N. Jr. // Prog. Clin. Biol. Res. – Vol. 81. Physiology and biology of horseshoe crabs: Studies on normal and environmentally stressed animals. – Alan K. Liss Ins., N.-Y., 1982. – P. 1–52.
6. Levin J. // Fed. Proc. – 1967. – Vol. 26. – N 6. – P. 1707–1712.
7. Copley A.L. // Fed. Proc. – 1947. – Vol. 6. – N 1. – P. 90.
8. Murer E.H., Levin J., Holme R. // J. Cell Physiol. – 1975. – Vol. 86. – N 3. – P. 553–542.
9. Solum N.O. // Thromb. Diath. Haemorrh. – 1970. – Vol. 23. – N 1. – P. 170.
10. Morrisen H., Rothman W.H. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1975. – Vol. 94. – P. 21–23.
11. Bryan F.T.C. et al. // Science. – 1964. – Vol. 144. – N 3620. – P. 1147–1148.
12. Novitsky T.J. // Oceanus. – 1984. – Vol. 27. – N 1. – P. 13–18.
13. Jordensen J., Smith R.F. // Apll. Microbiol. – 1973. – Vol. 26. – N 1. – P. 43–48.
14. Sullivan J.D., Watson S.W. // Apll. Microbiol. – 1974. – Vol. 28. – N 6. – P. 1023–1026.

3. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ГЕЛИРОВАНИЯ ЛИЗАТА АМЕБОЦИТОВ

3.1 Гелирование лизата амебоцитов под действием эндотоксинов грамотрицательных бактерий

По последним представлениям, в лизате амебоцитов мечехвостов содержится, по крайней мере, 5 белковых компонентов, связанных с системой коагуляции. Это растворимый, способный свертываться белок коагулоген и 3 сериновые протеазы, представляющие ферментную систему и находящиеся в амебоцитах в виде предшественников (факторы С и В, а также профермент). Действие эндотоксина, являющегося ЛПС, приводит к активации чувствительного к нему фактора С, что в дальнейшем приводит к последовательной активации фактора В и профермента; активная форма последнего трансформирует коагулоген в коагулин-гель. Пятым белком, участвующим в коагуляции, является недавно обнаруженный анти-ЛПС-фактор, блокирующий реакцию гелеобразования. Кроме этих компонентов, в цитоплазме амебоцитов обнаружен белок, названный фактором G; он также является предшественником фермента. Этот фактор активируется не ЛПС, а (1→3)-β-D-глюканом, активная его форма приводит к трансформации профермента в активный свертывающий фермент, что, в конечном счете, также приводит к образованию геля.

Таким образом, в лизате амебоцитов есть по меньшей мере два пути коагуляции: инициируемый эндотоксином (ЛПС) и инициируемый полисахаридами (1→3)-β-D-глюканом; оба приводят к образованию геля. Схема взаимодействия вышеперечисленных факторов коагуляции представлена на рис. 2.

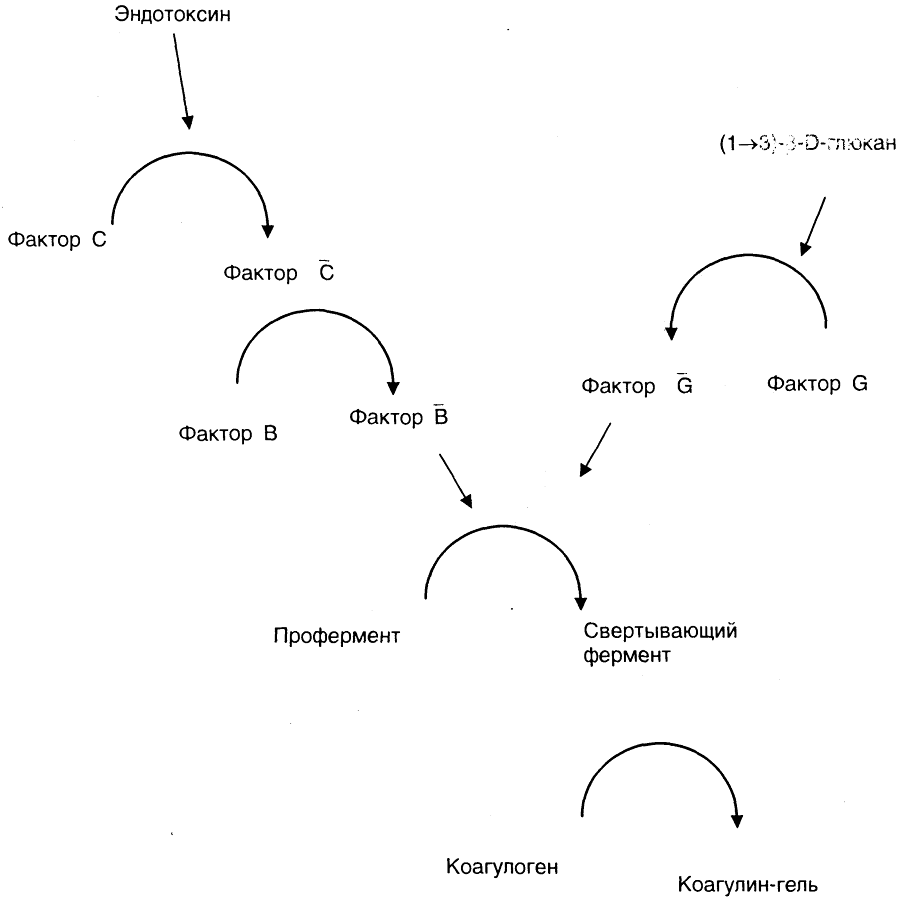

Рис. 2. Схема активации системы коагуляции мечехвоста под действием эндотоксина и (1→3)-β-D-глюкана

В настоящем разделе приводится характеристика свойств идентифицированных к настоящему времени факторов свертывания, а также доказательства их места в системе коагуляции. Необходимо отметить, что большинство работ по биохимии факторов свертывания, особенно касающихся первых факторов каскада (см. рис. 2), проведены японскими исследователями, которые использовали гемолимфу мечехвоста Tachypleus tridentatus. Сходные данные получены и для системы свёртывания

мечехвоста Limulus polyphemus. Безусловно, возможны некоторые различия в строении и свойствах этих белков у животных разных видов, однако эти отличия не затрагивают общей схемы коагуляции. Существуют различия и в номенклатуре этих белков. Японские исследователи называют первый фактор системы коагуляции T. tridentatus фактором С (активная форма С), второй – фактором В (активная форма В) [1–6]. Соответствующие им факторы свертывания в системе коагуляции L. polyphemus названы протеаза N и проактиватор (активная форма – активатор) [7–8]. В данном обзоре, с тем чтобы избежать путаницы, используется терминология, принятая для мечехвоста T. tridentatus. Названия коагулоген и профермент (активная форма – свертывающий фермент) общеприняты.

Фактор С (активная форма – Фактор С)

Фактор С выделен из лизата амебоцитов мечехвостов L. polyphemus и T. tridentatus [1, 2, 5, 8]. Он представляет собой гликопротеид с молекулярной массой (ММ) около 123 000, состоящий из двух полипептидных цепей – тяжелой (ММ 80 000) и легкой (ММ 43 000), связанных дисульфидными мостиками. Аминокислотный анализ фактора С показал, что молекула состоит из 1 027 аминокислотных остатков [2].

Активация фактора С происходит при инкубировании его с эндотоксином, в отсутствии эндотоксина активации не происходит. ММ активного фактора С и ММ его тяжелой цепи равны аналогичным предшественника. Однако лёгкая цепь активного фактора С имеет ММ меньше на 9 000. Кроме того, обнаружен новый фрагмент – полипептид с ММ 8 500. Это позволяет предположить, что во время активации происходит ограниченный протеолиз, и молекула активного фактора С состоит из трех полипептидных цепей, связанных дисульфидными мостиками (рис. 2). Однако точный механизм активации фактора С остается невыясненным. Возможно фактор С связывается с ЛПС, образуя высокомолекулярный комплекс [2].

Естественным субстратом для фактора С является фактор В. Фактор С не активирует профермент, не действует на коагулоген, он не активирует различные факторы коагуляции млекопитающих, такие как фактор IX, фактор X, протромбин, пептид С, прекалликреин, не приводит к образованию фибрин-геля из фибрина. Все это свидетельствует о высокой специфичности фактора С. Подходящим искусственным хромогенным субстратом для фактора С является ТБОК-Вал-Про-ПНА

(ТБОК-трет-бутоксикарбонил; ПНА – п-нитроанилид) [2]. Активность фермента ингибируется естественным ингибитором сериновых протеаз плазмы – антитромбином-III; ингибитором оказывается и диизопропилфторфосфат (ДФФ). Бензамидин и леупептин в высоких концентрациях также оказываются ингибиторами. Это характеризует фактор С как сериновую протеазу. ДФФ – чувствительный активный центр локализован в легкой цепи (ММ 34 000) фактора С [2-8]

Фактор В (активная форма – Фактор В)

Фактор В, активирующий профермент, был впервые выделен из лизата амебоцитов T. tridentatus в 1980 г. [6]. В 1982 г. Накамура и Левин [7] выделили аналогичный фактор из лизата амебоцитов L. polyphemus. Фактор В имеет ММ около 64000 и состоит из двух полипептидных цепей, связанных друг с другом одним или несколькими дисульфидными мостиками (см. рис. 3) [1].

Фактор В не является чувствительным к эндотоксину, он активируется фактором С [2, 5, 8]. Активный фактор В состоит из двух полипептидных цепей, связанных дисульфидными мостиками [5]. Фактор В переводит профермент в активный свертывающий фермент путём ограниченного протеолиза [3]. Оптимальная величина pH для этой реакции 6,0–8,0 [7]. Действие фактора В ингибируется бензамидином, трипсиновым ингибитором соевых бобов, леупептином и ДФФ, что характеризует его как сериновую протеазу трипсинового типа [3, 7].

Профермент (активная форма – свертывающий фермент)

Профермент представляет собой одноцепочечный гликопротеид с ММ около 54 000 [3]. Профермент переходит в свертывающий фермент в присутствии активного фактора В , эта реакция полностью завершается за 15 мин [5]. Интересно отметить, что профермент тоже может активироваться трипсином в концентрации от 10 до 100 мкг/мл, в то время как другие протеазы, такие как тромбин, плазмин, папаин, урокиназа или α-хемотрипсин не оказывают этого действия. Активированный трипсином свёртывающий фермент проявляет такую же субстратную специфичность, что и свёртывающий фермент, активированный фактором В . Можно предположить, что во время активации профермента происходит ограниченный протеолиз связей Арг-х и Лиз-х в молекуле профермента [7]. Во время активации одноцепочечный пептид разрезается на две цепи: тяжёлую (ММ 31 000) и лёгкую (ММ 27 000), связанные

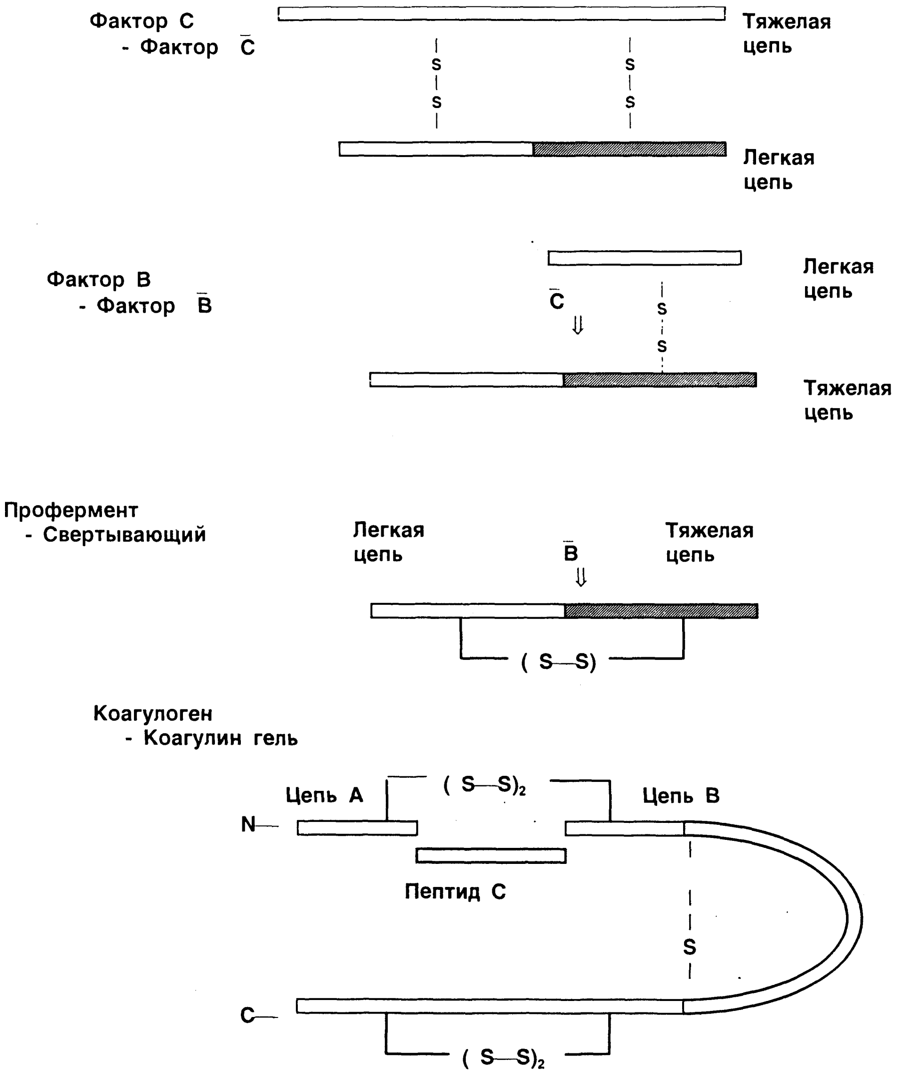

Рис. 3. Схема строения и активации факторов свертывания коагуляционной системы мечехвостов (штриховкой обозначены ДФФ-чувствительные участки цепей)

дисульфидными мостиками (см. рис. 3). Фермент содержит 6 % гексозаминов [5].

Он не является витамин К-зависимым белком, как семейство протромбинов позвоночных, так как содержание γ-карбоксиглутаминовой кислоты в нём очень низко [1, 3].

Естественным субстратом для свертывающего фермента является коагулоген, он также может активировать протромбин, приводя к образованию α-тромбина [9]. Свертывающий фермент гидролизует хромогенный субстрат Лей-Гли-Арг-ПНА, высвобождая ПНА [10, 11].

Свертывающий фермент ингибируется ДФФ, он чувствителен к бензамидину; очень эффективными оказываются естественные ингибиторы сериновых протеаз плазмы: антитромбин III и α-антиплазмин [9]. ДФФ-чувствительный активный центр находится в тяжелой цепи свёртывающего фермента (см. рис. 3) [4]. Всё это свидетельствует о том, что свертывающий фермент тоже является сериновой протеазой, участвующей в каскаде коагуляции.

Коагулоген

Коагулоген – способный свертываться белок, находящийся в амебоцитах мечехвостов, является наиболее хорошо изученным фактором системы свёртывания. В настоящее время получены в чистом виде и изучены коагулогены мечехвостов трех видов: L. polyphemus, T. tridentatus и T. gigas. Коагулоген представляет собой одноцепочечный полипептид, состоящий из 175 аминокислотных остатков [5], и имеет ММ около 19 700 [4]. Белок содержит 16 остатков молекул цистеина, связанных между собой дисульфидными связями; пять из них локализованы в области С-конца молекулы. Интересно отметить, что все остатки цистеина находятся в одних и тех же линейных позициях в коагулогенах всех трёх видов мечехвостов. Это позволяет предположить, что все эти молекулы имеют очень похожую конформацию [4].

Под действием свертывающего фермента растворимый коагулоген переходит в нерастворимый коагулин-гель, при этом белковая молекула разрезается ферментом на три части: цепи А и В и пептид С. Свёртывающий фермент разрезает связи $Арг_{18}$-$Тре_{19}$ и $Арг_{46}$-$Гли_{47}$, локализованные в области N-конца молекулы коагулогена. Разрываемая связь Арг-Гли – связь того же типа, что и разрываемая а-тромбином при трансформации фибриногена млекопитающих в фибрин [3, 5]. В результате действия фермента в свободном виде высвобождается пептид С, состоящий из 28 аминокислотных остатков, а образующийся гель

состоит из цепи А (18 аминокислотных остатков) и цепи В (129 аминокислотных остатков), связанных двумя дисульфидными мостиками [4]. Полные аминокислотные последовательности коагулогенов всех трех мечехвостов имеют заметную гомологию, особенно в цепях А и В, состоящих из 147 остатков аминокислот: 73–92 % последовательностей в этих цепях содержат те же самые аминокислотные остатки в идентичных позициях. Гомологии в пептидах С меньше, чем в цепях А и В. Здесь гомологичны примерно 43–57 % структуры [4]. Это можно объяснить тем, что пептид С высвобождается свертывающим ферментом и не принимает участия в образовании геля, поэтому его структура не имеет такого значения, как структура цепей А и В. Важно отметить, что С-концевой участок цепи А Лей-Гли-Арг, пептида С и Сер-Гли-Арг – полностью идентичны у всех коагулогенов. Эти олигопептидные последовательности, возможно, необходимы для узнавания свертывающим ферментом разрезаемых связей [3, 5].

Для установления последовательности действия факторов свертывания в системе коагуляции мечехвоста были проведены эксперименты с использованием различных комбинаций очищенных факторов С и В, профермента, а также эндотоксина в качестве инициатора реакции и хромогенного субстрата ТБОК-Лей-Гли-Арг-ПНА для измерения амидазной активности образующегося в ходе реакции свертывающего фермента. Сильная амидазная активность была отмечена для реакционной смеси, содержащей все три фактора коагуляции – факторы С и В и профермент. Для комбинации факторов С и В, а также профермента и фактора С не было замечено амидазной активности. Были также проведены эксперименты с использованием очищенного активного фактора С , фактора В и проферментов в отсутствии эндотоксина. Смесь факторов С , В и профермента проявляла сильную амидазную активность, однако смесь фактора С и профермента амидазной активности не обнаруживала. Эти результаты показывают, что для активации профермента требуются все три компонента и что фактор С является инициирующим в системе коагуляции. [2].

Анти-ЛПС-фактор

Кроме перечисленных выше факторов коагуляции, в лизате амебоцитов L. polyphemus и T. tridentatus обнаружен также потенциальный антикоагулянт, ингибирующий вызываемую эндотоксином (ЛПС) реакцию коагуляции. Он был назван анти-ЛПС-фактор [12]. ММ очищенного анти-ЛПС-фактора, определенная методом гель-фильтрации, составляет около

10 000 [12]; по другим данным, она равна 15 000 [3]. Фактор состоит из 128 аминокислотных остатков. Исследование аминокислотного состава показало, что анти-ЛПС-фактор содержит относительно большое количество треонина, серина, глицина и лизина. Содержание гексозаминов в анти-ЛПС-факторе менее 0,1 %, поэтому можно предположить, что он представляет собой белок, состоящий из простых аминокислотных остатков [3, 4]. Анти-ЛПС-фактор ингибирует инициируемую эндотоксином коагуляцию лизата амебоцитов [12], по-видимому блокируя начальную стадию процесса связывания ЛПС с фактором С. Анти-ЛПС-фактор не оказывает ингибирующего действия на активные формы фактора В и на свёртывающий фермент [12]. Интересно, что анти-ЛПС-фактор оказывает ингибирующее действие на рост грамотрицательных бактерий Salmonella minnessota R599 и E. coli 1114W, но не оказывает такого действия на рост грамположительных бактерий Staphylococcus aureus 209p [13]. Вероятно присутствие анти-ЛПС-фактора в амебоцитах L. polyphemus и T. tridentatus играет важную роль в системе защиты мечехвостов от вторжения микроорганизмов, хотя роль этого фактора до конца не известна. Высказывается предположение, что он может либо нейтрализовать эндотоксин, либо оказывать на него разрушающее действие и, наконец, может связываться с активным центром ЛПС, конкурируя таким образом с эндотоксин-чувствительным фактором [9].

Присутствие анти-ЛПС-фактора – естественного антикоагулянта – в лизате амебоцитов может снижать чувствительность коагуляционной системы к действию эндотоксина. Поэтому в процессе приготовления ЛАЛ-реагента ингибитор стараются удалить из лизата, как правило, используя для этого экстракцию органическими растворителями.

3.2. Гелирование лизата амебоцитов, не связанное с действием эндотоксинов. Ингибиторы реакции

Наличие каскада ферментов объясняет высокую чувствительность и специфичность ЛАЛ-реактива по отношению к эндотоксинам. Долгое время считалось, что специфичность ЛАЛ-теста к эндотоксинам абсолютная, однако постепенно были обнаружены другие вещества, способные вызывать гелирование и не имеющие с эндотоксинами ничего общего. Для подтверждения этого факта проводился строгий контроль ЛАЛ-реактива на загрязнённость эндотоксинами, доказывающий, что гелирование лизата не вызвано эндотоксинами, содержащимися в

препарате. Биохимия действия веществ, вызывающих неспецифическое гелирование, изучена в разной степени. Наиболее хорошо исследовано действие β-глюкана и даже выделен в лизате фактор, который активируется этим полисахаридом.

Действие полинуклеотидов, пептидоглюканов на коагуляционную систему Limulus изучено меньше, но есть попытки объяснения и их действия. Ниже приводится описание веществ, способных вызывать гелирование лизата помимо эндотоксина.

Действие полисахаридов на коагуляционную систему мечехвоста L. polyphemus было обнаружено при исследовании пирогенности противоопухолевого препарата – карбоксиметилированного (1→3)-β-глюкана (КМПС) [14]. Этот препарат, апирогенный в тесте на кроликах, вызывал гелирование лизата амебоцитов. Активация ферментной системы наблюдалась в диапазоне концентраций КМПС 10^{-6}–10^{-3} мг/мл. Ниже и выше этого диапазона активации не наблюдалось. Оптимальная концентрация – 10^{-5}–10^{-4} мг/мл [14]. При дальнейшем исследовании реакции ЛАЛ с КМПС в лизате амебоцитов был выделен новый фактор, названный фактором G, который активируется в присутствии КМПС в указанных выше концентрациях, но не активируется эндотоксинами. Активный фактор G (фактор G) превращает профермент в свёртывающий фермент и тот, в свою очередь, катализирует превращение коагулогена в гель [15]. КМПС не активирует факторы коагуляции, действующие по механизму, инициируемому эндотоксинами (фактор B). Добавление эндотоксина (1 нг/мл) или КМПС (10^{-4} мг/мл) к лизату, в котором активация фермента, вызванная 10^{-4} мг/мл КМПС или 10^{-6} мг/мл эндотоксина, была завершена, приводит к дополнительной активации профермента [14]. Это указывает на присутствие двух независимых друг от друга механизмов активации профермента. Таким образом, в лизате амебоцитов мечехвостов L. polyphemus и T. tridentatus существуют по меньшей мере, 2 механизма коагуляции, каждый из которых приводит к активации профермента и гелированию лизата (см. рис. 2). Кроме КМПС, гелирование лизата могут вызывать и другие противоопухолевые полисахариды. Для них также существуют оптимальные концентрации, вызывающие гелирование лизата.

Другим веществом, способным вызвать гелирование лизата, является сополимер полирибоинозиновой кислоты с полирибоцитидиловой кислотой (поли-И-поли-Ц). Этот полимер также пирогенен для кроликов [16, 17]. Однако концентрация этого полимера должна быть примерно в 2 000 раз выше концентрации эндотоксина [16]. Механизм активации ЛАЛ-реактива

поли-И-поли-Ц может быть сходным с механизмом активации ЛАЛ-реактива бактериальным эндотоксином. Как и в случае с эндотоксином, очищенный коагулоген не реагирует с поли-И-поли-Ц. Таким образом, поли-И поли-Ц активирует какой-то компонент коагуляционной системы, который, в свою очередь, приводит к трансформации коагулогена в гель. Возможно, что это тот же самый компонент, который активируется эндотоксином. Действие полинуклеотида может быть объяснено структурным сходством между липидной частью бактериального эндотоксина (липидом А) и полинуклеотидами. Жирные кислоты липида А могут представлять собой двойник нуклеиновых кислот в полинуклеотидах. Частичная гомология между двумя веществами, вероятно, может объяснить сходные свойства пирогенности и ЛАЛ-реактивности [16].

ЛАЛ-тест считается специфичным по отношению к грамотрицательным бактериям и их эндотоксинам. Живые грамположительные бактерии в отличие от живых грамотрицательных не вызывают гелирования лизата. Показано, что пептидоглюканы, производные клеточной стенки грамположительных микроорганизмов могут вызывать эту реакцию [18]. Это обстоятельство способно поставить под сомнение специфичность теста, однако активность пептидоглюканов в 1 000–400 000 раз меньше активности эндотоксинов (например, для гелирования лизата достаточно 0,0005 мкг/мл эндотоксина E. coli или 40–400 мкг/мл пептидоглюканов различных грамположительных бактерий) [18]. Столь высокие концентрации пептидоглюканов, требующиеся для гелирования, маловероятны в случаях клинического применения ЛАЛ-теста для обнаружения эндотоксинов в крови или при проверке на пирогенность парентеральных лекарств.

Выше отмечалось большое сходство факторов коагуляции мечехвоста с факторами коагуляции млекопитающих. Поэтому нет ничего удивительного в обнаружении способности тромбина и тромбопластина вызывать реакцию гелирования лизата [17]. Такое действие активаторов коагуляционных систем млекопитающих может вызывать затруднения при оценке результатов ЛАЛ-теста в случае применения его для обнаружения эндотоксинов в крови.

Эти факты свидетельствуют о возможности получения неправильного ответа при проведении анализа на эндотоксины. По-видимому, нельзя ожидать абсолютной специфичности от такой сложной биологической системы, какой является лизат амебоцитов. Можно предположить, что при существующем в настоящее время широком спектре областей применения ЛАЛ-препарата будут и в дальнейшем обнаруживаться вещества, вызывающие гелирование лизата помимо эндотоксинов. Тем

не менее это нисколько не умаляет значение теста для обнаружения эндотоксина. Например, при оценке известных в настоящее время веществ, вызывающих гелирование, необходимо учитывать, что они вызывают гелирование лизата в концентрации в 1 000–400 000 раз больше, чем концентрация эндотоксина, необходимая для гелирования. К тому же отмечалось, что для некоторых из них необходим строго ограниченный диапазон концентраций. Поэтому эту проблему можно обойти разведением испытуемого раствора. Благодаря высокой чувствительности теста к эндотоксинам их определение остается возможным и при сильном разведении раствора.

Реакция между эндотоксином и ЛАЛ-препаратом может ингибироваться различными искусственными и естественными ингибиторами коагуляции млекопитающих. Примеры действия таких ингибиторов на факторы свертывания L. polyphemus приводились выше при описании биохимии свертывания. Известны также и другие ингибиторы, способные блокировать эту реакцию на различных стадиях. Это диметилсульфоксид, мочевина, хлорид натрия [19–21]. Присутствие ингибитора может привести к ложноотрицательным результатам при определении пирогенности лекарств или обнаружении эндотоксинов в крови и т.д. Однако ингибирование легко распознаётся и легко устраняется. Наибольшие сложности возникают при анализе крови, плазмы или препаратов, полученных из них. В этом случае естественные антикоагулянты, содержащиеся в крови, ингибируют реакцию коагуляционной системы L. polyphemus. Однако и эту проблему можно обойти разведением, нагреванием, экстракцией пробы перед определением, ультрафильтрацией, диализом или другими способами.

Список литературы

1. Nacamura T., Morita T., Iwanaga S. // Thrombos i Haemostas. – 1983. – Vol. 50. – N 1. – P. 405.
2. Nacamura T., Morita T., Iwanaga S. // Eur. J. Biochem. – 1986. – Vol. 154. – N 3. – P. 511–521.
3. Morita T. et al. // Proteinase inhibitors: Medical and biological aspects. – Ed. N. Katsunuma, H. Umezawa, H. Holzer: Japan Soi. Soc. Press, Tokyo / Springer-Verlag, Berlin, 1983. – P. 229–241.
4. Morita T. et al. // Prog. Clin. Biol. Res. – Vol. 189: Bacterial endotoxins: Structure, biomedical singnificance, and detektion with the Limulus amebocyte lysate test. – Alan R.Liss. Inc., N.-Y., 1985. – P. 53–64.
5. Iwanaga S. et al. // Bacterial endotoxins: Chemical, biological and clinical aspects. – Verlag Chemie, Heidelberg, 1984. – P. 365–382.
6. Ohki M. et al. // FEBS Letters. – 1980. – Vol. 120. – N 2. – P. 217–220.
7. Nacamura T., Levin J. // Biochem. Biophys. Acta. – 1982. – Vol. 707. – N 4. – P. 217–225.
8. Nacamura T., Levin J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1982. – Vol. 108. – N 4. – P. 1619–1623.
9. Nacamura T. et al. // J. Biochem. – 1982. – Vol. 92. – N 2. – P. 781–792.
10. Nacamura T. et al. // J. Biochem. – 1977. – Vol. 81. – N 5. – P. 1567–1569.
11. Iwanaga S. et al. // Haemostasis. – 1978. – Vol. 7. – N 1. – P. 183–188.
12. Tanaka S. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1982. – Vol. 105. – N 2. – P. 717–792.
13. Ohtsubo S. et al. // Thromb. Haemostas. – 1983. – Vol. 50. – N 1. – P. 54.
14. Kakinuma A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1981. – Vol. 101. – N 2. – P. 434–439.
15. Morita T. et al. // FEBS Letters. – 1981. – Vol. 129. – N 2. – P. 318–321.
16. Elin R.J., Wolff S.M. // J. Infect. Dis. – 1973. – Vol. 128. – N 3. – P. 349–352.
17. Elin R.J., Utter A.E. // J. Clin. Microbiol. – 1980. – Vol. 12. – N 4. – P. 502–505.
18. Wildfeuer A. et al. // Appl. Microbiol. – 1974. – Vol. 28. – N 5. – P. 867–871.

19. *Liang S.M., Liu T.-Y. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1982. – Vol. 105. – N 2. – P. 553–559.*
20. *Schleef R.R., Shepro D., Kenney D.M. // Thromb. Res. – 1982. – Vol. 27. – N 6. – P. 729–735.*
21. *Schleef R.R., Kenney D.M., Shepro D. // Thromb. Haemost. – 1979. – Vol. 41 – N 2. – P. 329–336.*

4. СТАНДАРТЫ ЭНДОТОКСИНА

ЛАЛ-тест дает возможность количественного определения концентрации эндотоксина в испытуемом растворе. Для этого сравнивают реакцию ЛАЛ-реактива с раствором, содержащим эндотоксин в неизвестной концентрации, и его реакцию с раствором стандартного препарата эндотоксина в известной концентрации. Определенную с помощью ЛАЛ-реактива концентрацию эндотоксина в испытуемом растворе выражают в каких-либо единицах. В ранних работах ее выражали в милли-, нано- или пикограммах эндотоксина на 1 мл раствора. Однако недостатком такого подхода является невозможность сравнения результатов, полученных в разных лабораториях с использованием различных стандартов. Дело в том, что различные стандарты имеют разную активность при сравнении по ЛАЛ-реактиву. Отличия эти могут быть связаны не только со штаммом бактерии. Они могут существовать даже для разных партий одного и того же стандарта. Различная активность стандартов эндотоксина, приготовленных из разных видов бактерий, вызвана, в основном, химическим различием главного компонента эндотоксина – молекулы липополисахарида. Причинами различной активности стандартов эндотоксинов, приготовленных из одного и того же штамма бактерий, могут оказаться разная степень очистки препарата, разные условия культивирования микроорганизмов или разные методы экстракции ЛПС. И, наконец, наиболее частыми причинами различия активности стандарта эндотоксина разных партий одного и того же препарата могут быть нарушения условий хранения или технологические погрешности.

Решением проблемы могло стать создание легко доступного, стабильного единого стандарта эндотоксина, используя который все лаборатории могли бы сравнивать свой стандарт эндотоксина с таким общим стандартом и выражать результаты этого сравнения в

общепринятых единицах. В США работы по созданию такого стандарта проводились Bureau of biologics FDA. При работе над таким стандартом были сформулированы критерии "идеального стандарта". Он должен быть:

- приготовлен одной партией и в достаточном количестве;
- стабилен при комнатной температуре;
- приготовлен из распространенного вида бактерий;
- высушен;
- не гигроскопичен;
- легко растворяться в воде с образованием прозрачного раствора;
- проверен на кроликах и человеке.

В 1972 г. был приготовлен первый стандарт из Klebsiella pneumonae. Препарат был высушен с 0,1 % раствором человеческого сывороточного альбумина. Он получил название Lot 1b. Но этого препарата было очень мало и он был приготовлен из нечасто встречающейся бактерии. В 1974 г. было решено заменить Lot 1b на стандарт, который отвечал бы всем требованиям. Этот стандарт был назван US Natonal Referense Standard Endotoxin (RSE) и представлял собой фенольный экстракт Escherichia. coli 0113:H10:K. Первая его партия, приготовленная в 1976 г., получила название ЕС-1. Это была маленькая пилотная партия из 200 флаконов, которой не хватило даже на год. Затем была приготовлена вторая партия ЕС-2, состоящая примерно из 1 200 флаконов. Этот стандарт был откалиброван по реакции с ЛАЛ-реактивом. Активность эндотоксина стали выражать в эндотоксинных единицах (э.ед., Endotoxin unit, EU). Было принято, что 0,2 нг эндотоксина партии ЕС-2 соответствуют одной единице эндотоксина. К сожалению, к тому моменту, когда была установлена эта единица эндотоксина, от партии ЕС-2 осталось всего несколько флаконов. С тем чтобы сделать RSE более доступным, в 1982 г. Фармакопейный комитет США совместно с Office of Biologics FDA приготовили новую партию ЕС, состоящую примерно из 30 000 флаконов. Это была пятая партия серии ЕС. Партии ЕС-3 и ЕС-4 были пилотными, предшествующими ЕС-5, хотя в действительности ЕС-4 использовалась и как временный RSE, пока готовили и проверяли ЕС-5. Для установления активности нового стандарта было проведено исследование, в котором участвовали многие лаборатории. В результате оказалось, что активность партии ЕС-5 примерно вдвое больше активности ЕС-2, т.е. ЕС-5 примерно в два раза активнее в реакции с ЛАЛ-реактивом, чем ЕС-2, если сравнивать их в весовых единицах. Но весовые единицы не упоминаются в связи с RSE. На флаконах

указывается только количество единиц эндотоксина, которое он содержит – 10 000 э.ед. [1, 2].

Этот основной или базовый стандарт эндотоксина достаточно дорог и поэтому он, как правило, используется для калибровки активности других стандартов эндотоксина. Фирмы производители ЛАЛ-реактива или отдельные пользователи имеют право выпускать свои собственные стандарты эндотоксина, которые называются контрольным стандартом (Control Standard Endotoxin, CSE). В этом случае активность контрольного стандарта определяется путем сравнения активности CSE и RSE по ЛАЛ-реактиву и выражается в единицах эндотоксина на нг CSE. В настоящее время наиболее часто используются следующие контрольные стандарты эндотоксина (CSE): эндотоксин Escherichia. coli 055:B5, являющийся официальным стандартом Health Industry Manufacturers Association (HIMA) и Office of Medical Devices (OMD) FDA. Этот стандарт использовался OMD при установлении предела содержания эндотоксина на поверхности медицинских инструментов и аппаратов; эндотоксин Shigella dysenteriae – стандарт ВОЗ (World Health Organisation (WHO). Эндотоксин Salmonella abortus equi – препарат эндотоксина под названием Novo-Pyrexal, выпускаемый фирмой Hermal Chemie. Используются также и несколько других стандартов эндотоксина, большинство из которых поставляются вместе с наборами ЛАЛ. Примерами могут служить эндотоксин E. coli 0127:B8, используемый фирмой UpJohn, или наиболее часто встречающийся стандарт эндотоксина, поставляемый с ЛАЛ-реактивом E. coli 0111:B4 [2, 3], который используется в качестве официального стандарта Фармакопеи КНР.

В таблице 1 представлены официальные стандарты эндотоксина, используемые в различных фармакопеях.

Таблица 1

Официальные стандарты эндотоксина

Регламентирующий документ	Наименование стандарта	Штамм бактерии продуцента	Содержание во флаконе
Фармакопея США	EC-5	E.coli. 0113:H10:K	10 000 э.ед./флакон
Фармакопея Италии, IX 1985	EC-5	E.coli. 0113:H10:K	10 000 э.ед./флакон
Европейская Фармакопея	NP-1	Salmonella abortus equi	1000 нг/флакон
Требования ВОЗ	86/650	E.coli 0113:H10:K	14 000 э.ед./флакон
Фармакопея КНР	89-6	E.coli 0111:B4	2 800 э.ед/флакон

В Фармакопее США указывается, что CSE должен иметь активность не менее 2 э.ед./нг и не более 50 э.ед./нг. Активность CSE должна устанавливаться по RSE для каждой партии ЛАЛ-реактива. Дело в том, что реакционная способность одной и той же партии ЛАЛ-реактива с разными стандартами не оказывается одинаковой [2, 3]. В реальной практике это означает, что две партии ЛАЛ независимо от одного или разных производителей, имеющие одинаковую заявленную чувствительность по EC-5, могут дать разные результаты в тесте с другим, отличающимся от EC-5 эндотоксином. Например, стандарт ВОЗ (эндотоксин Shigella dysenteriae) при сравнении его с RSE с помощью двух разных коммерческих ЛАЛ-реактивов (Pyrogent и Pyrotell) демонстрировал различную активность, равную 2,49 э.ед./нг в тесте с Pyrogent и 0,50 э.ед./нг в тесте с Pyrotell. В последнем случае его активность даже не удовлетворяла требованиям USP, по которым CSE должен иметь активность не меньше 2,0 э.ед./нг [4]. Поэтому в USP в главу "Тест на бактериальные эндотоксины" включен раздел сравнения RSE и CSE. С этой целью проводят тест в котором используют 1 флакон RSE и 4 флакона CSE. После разведения RSE готовят серию последовательных разведений стандарта. Для проведения теста выбирают серию, состоящую из 4 последовательных двукратных разведений, которая перекрывает заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива. Например, если чувствительность ЛАЛ-реактива заявлена равной 0,25 э.ед./мл, то должна использоваться серия разведений RSE, включающая концентрации 0,5; 0,25; 0,125 и 0,06 э.ед./мл. Так же готовят серии разведений 4 флаконов CSE. Таким образом в тесте используются 4 разные разведения RSE и по 4 разведения CSE для каждого из 4 флаконов. ЛАЛ-тест для каждого из этих разведений проводится в 4 повторностях. Таким образом, для серии разведения RSE требуется 16, а для четырех серий из четырех разведений CSE 64 пробирки, в которые вносится по 0,1 мл соответствующего разведения эндотоксина и по 0,1 мл ЛАЛ-реактива. Для проведения этого теста требуется 8 мл ЛАЛ-реактива (80 пробирок x 0,1 мл) и еще 0,1 или 0,2 мл для отрицательного контроля.

Все эти пробирки должны инкубироваться в одном штативе, или (если это невозможно) – в одном штативе для каждой серии разведений. Все серии должны инкубироваться в одной водяной бане или термостате. По окончании инкубирования тесты оцениваются как положительные или отрицательные. Результатом в каждой серии разведения эндотоксина является последняя (наименьшая) концентрация эндотоксина, давшая

твердый гель в этой серии. Эти результаты затем используются для расчета активности CSE в э.ед./нг.

Для того чтобы избавить своих потребителей от проведения этого громоздкого теста, многие фирмы производители ЛАЛ-реагента сопровождают поставляемую партию ЛАЛ сертификатом сравнения RSE/CSE.

Проблема выбора стандарта эндотоксина достаточно серьезна еще и потому, что используемый в качестве стандарта эндотоксин, как правило, не является естественным загрязнителем лекарств. Действительно, E. coli не является главной причиной загрязнения воды, используемой в фармацевтической промышленности. "Естественные" эндотоксины, которые попадают в лекарственные препараты могут реагировать с ЛАЛ-реактивом иначе, чем очищенный стандарт. Хотя и считается, что "естественные" эндотоксины менее пирогенны, чем очищенный стандарт, теоретически возможно, что некоторые из этих естественных эндотоксинов могут оказаться активнее эндотоксина E. coli. [3]. Это одна из причин, по которой FDA настаивает на пределе, равном 5,0 э.ед./кг – значении, при котором продукт, загрязненный естественными эндотоксинами ниже этого уровня, не оказывает неблагоприятного действия на человека и животных.

ЛАЛ-реактив выпускают в основном фирмы США. Они проверяют чувствительность своих препаратов по RSE или по своим контрольным стандартам, также откалиброванным по RSE. Поэтому естественно, что принятая в США размерность концентрации эндотоксина распространяется и на другие страны, использующие ЛАЛ-тест для контроля качества фармацевтической продукции. Стандарт RSE EC-5 является официальным и для Италии, поскольку описан в Фармакопее Италии IX издания. Кроме того, ВОЗ поручила Национальному институту стандартизации и контроля биологических препаратов (Лондон) разработать международный стандарт эндотоксина, приняв за основу смесь эндотоксинов E. coli, из которой был приготовлен национальный стандарт США. Такой стандарт был приготовлен и получил код 86/650 (WHO/BS/85.1495). Он представляет собой сублимационно высушенный препарат.

Сублимационно высушенный препарат не лишен некоторых недостатков. Сушка ограничивает размеры партии. Так, при изготовлении стандарта EC-5 в действительности работали несколько сублимационных установок при одинаковых условиях. Это, естественно, увеличивает возможности вариации от флакона к флакону. К счастью, было показано, что такие вариации незначительны. Сушка плоха еще и из-за

невозможности точного воспроизведения условий во время замораживания и высушивания, все это ставит под сомнение возможность воспроизведения партии. К тому же необходимость растворять высушенный стандарт увеличивает возможность ошибки пользователя, связанной с разведением. Надо также отметить, что к ЕС-5 добавлены вспомогательные вещества. Считалось, что это необходимо для стабилизации стандарта во время сушки и для облегчения его последующего растворения. Поэтому к стандарту были добавлены лактоза и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Лактозы было добавлено в 10 000 раз, а ПЭГ в 100 раз больше (по весу), чем эндотоксина. Это очень много для "чистого" стандарта. В действительности же ЕС-5 сам по себе очень стабилен и не требует добавок для сушки. Высушенный препарат переходит в раствор всего за 10 мин [3].

Таким образом, сушка стандарта и тем более введение в него вспомогательных веществ не самое удачное решение, вызванное, главным образом, традиционным подходом к хранению биологически активных препаратов. Более удачным решением может оказаться стандарт эндотоксина в растворе. Такой стандарт значительно дешевле, способ приготовления его не лимитирует размеров партии, как это имеет место при лиофилизации. Доступность большого количества дешевого стандарта означает, что пользователи ЛАЛ-теста могут отказаться от использования контрольных стандартов и применять непосредственно RSE, что, в свою очередь, упростит сравнение результатов анализа эндотоксина, полученных с помощью разных ЛАЛ-реактивов. Будет устранена возможность ошибки при разведении сухого стандарта. Немецкая фирма Hermal Chemie успешно готовит стандарт эндотоксина в виде раствора, называемого Novo-Pyrexal.

В 1987 году Комитетом Европейской Фармакопеи он был рекомендован в качестве стандарта эндотоксина для Европейской Фармакопеи под названием PBR. Он представляет собой раствор, содержащий 100 мг/мл ЛПС Salmonella abortus equi, что соответствует 1 000 международных единиц в 1 мл.

Высушенный эндотоксин достаточно стабилен. Хранить такой препарат можно, как правило, 2 года. Препарат разводят указанным количеством воды для ЛАЛ-теста и активно встряхивают в течение 30 мин, чтобы добиться полного растворения реактива. Растворенный стандарт хранят в холодильнике при температуре +2–8 °С не более 4 недель. Препарат нельзя замораживать, это может привести к потере его активности. Наиболее частой причиной потери активности разведенного стандарта

эндотоксина является адсорбция эндотоксина на стенках флаконов. Обнаружено, что общее количество адсорбированного эндотоксина зависит от площади контакта раствора эндотоксина и стекла. Таким образом, раствор низкой концентрацией изменяется значительнее, чем раствор высокой концентрацией, так как одно и то же количество эндотоксина будет адсорбировано из обоих растворов, а процент потерь будет больше для раствора с меньшей концентрацией. Особенно активно адсорбируют эндотоксин "новое стекло" и полипропилен. Поэтому использованное стекло, например стеклянные пробирки, которые прошли трехкратный цикл мойки, сушки и депирогенизации, и полистироловые пробирки лучше всего подходят для хранения эндотоксина. Надо также отметить, что пробирки из "использованного стекла" и полистирола прекрасно подходят для приготовления растворов CSE перед ЛАЛ-тестом [4]. Тем не менее серии разведений препарата эндотоксина, приготовленные из исходного раствора, хранить не рекомендуется. Их готовят непосредственно перед проведением теста.

Список литературы

1. Hochstein H.D. // Prog. clin. Biol. Res. – Vol. 93.: Endotoxins and their detection with Limulus amebocyte lysate. – Alan.R. Liss. Inc., N.-Y., 1982. – P. 141–151.
2. Novitsky T.J. // LAL Update. – 1984. – Vol. 2. – N 1.
3. Pearson F.C. et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1985. – Vol. 50. – N 1. – P. 91–93.
4. Novitsky T.J., Schmidt-Gengenbach J., Remillard J.F. // J. Parent. Sci. Technol. – 1986. – Vol. 40. – N 6. – P. 284–286.

5. МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАЛ-ТЕСТА

5.1. Методы проведения ЛАЛ-теста

Для определения наличия эндотоксина в испытуемых образцах, а также для оценки его количества существует множество методик, в основе которых лежат четыре основных способа: гель-тромб тест, в котором результаты оцениваются визуально по образованию твердого геля; турбидиметрический метод – по образованию помутнения реакционной смеси, оцениваемого инструментально; хромогенный метод – по образованию окрашивания, возникающего в результате введения в реакционную смесь хромогенного субстрата взамен коагулогена; колориметрический метод – с использованием способа определения количества осажденного эндотоксином белка по Лоури. Наиболее широко используется гель-тромб тест (gel-clot test). В этом тесте в результате реакции эндотоксина и ЛАЛ-реактива происходит образование твердого геля. Реакцию проводят в стеклянных пробирках, в которые вносят равные объемы ЛАЛ-реактива и испытуемого раствора, обычно по 0,1 мл каждого. Размер стандартных пробирок 10×75 мм связан с объемом реакционной смеси. Считается, что такой диаметр пробирки является оптимальным, а круглое дно пробирки облегчает образование геля (в случае положительной реакции гель образует правильную полусферу на дне пробирки). Лучше всего подходят для проведения теста стеклянные пробирки, но силиконированные стеклянные пробирки так же как и пластмассовые ухудшают образование геля [1, 2].

Как правило, пробирки снабжаются крышками, чтобы избежать загрязнения эндотоксином из воздуха во время анализа. Реакционную

смесь хорошо перемешивают, встряхивая пробирку, и выдерживают при 37 °С в течении 1 часа. Возможны некоторые варианты времени выдерживания реакционной смеси. Чаще всего его сокращают до 30 мин, иногда наоборот увеличивают до 2–4 час с целью увеличить чувствительность способа. Но в Фармакопее США (USP XX, XXI, XII и XXIII) время инкубирования строго определено равным 1 часу. По окончании инкубирования определяются результаты теста. Если в пробирке образовался твердый гель, который не разрушается при переворачивании пробирки на 180°, тест считается положительным на присутствие эндотоксинов. Отрицательным результатом считается отсутствие изменений состояния реакционной смеси после инкубирования или разрушение геля при переворачивании пробирки. В этом тесте невозможно точно определить концентрацию эндотоксина в растворе. Так, если чувствительность ЛАЛ-реактива равняется 1 э.ед./мл, то при содержании эндотоксина в испытуемом растворе в равной или большей концентрации результаты теста будут положительными. Для того чтобы определить концентрацию эндотоксина в таком растворе, его необходимо развести апирогенной водой до концентрации, в которой тест дает отрицательный результат. Обычно для определения концентрации эндотоксина готовят серию разведений препарата. Первые разведения могут быть в 10 раз, следующие – в 2 раза. За результат теста принимается последнее разведение, дающее твердый гель. Коэффициент разведения, умноженный на чувствительность ЛАЛ-реактива, дает значение концентрации эндотоксина в испытуемом растворе. Это значение является неточным, так как реальное значение концентрации эндотоксина находится где-то между последним разведением, давшим твердый гель, и следующим разведением. Таким образом, гель-тромб тест является полуколичественным. Минимальная концентрация эндотоксина, определяемая этим тестом, зависит только от чувствительности ЛАЛ-реактива.

Гель-тромб тест, проводимый в пробирках, является наиболее распространенным способом проведения анализа с помощью ЛАЛ-реактива. Однако, при ежедневном проведении анализов разных партий лекарств с количественным определением содержания в них эндотоксина актуальным становится вопрос более экономного использования ЛАЛ-реактива. Опыт использования теста показывает, что объемы ЛАЛ-препарата и испытуемого раствора можно сократить с 100 мкл до 50 мкл. Однако ниже этого объема возможны ложноположительные результаты из-за адгезии малого объема реагента на дне пробирки [3].

Поэтому были разработаны способы проведения теста, в которых объемы ЛАЛ-реактива и испытуемого раствора значительно сокращены, а вместо пробирок используются стеклянные пластинки (как правило, предметные стекла для микроскопии). Первая такая модификация пробирочного гель-тромб теста, получившая название слайд тест (slide test), появилась в 1974 г. [4]. В этом тесте 10 мкл ЛАЛ-реактива помещают на поверхность стекла с помощью калиброванного капилляра или микропипетки (и стекло и капилляры должны быть апирогенны). К раствору ЛАЛ-реактива добавляется 10 мкл испытуемого раствора, смесь перемешивают с помощью капилляра. Таким же способом ставится положительный и отрицательный контроль. Следует избегать образования воздушных пузырей или удалять их с помощью апирогенной иглы. Все капли, помещенные на стекло, должны одинаково двигаться (подрагивать) при аккуратном постукивании пальцем по краю стекла. Стекло помещают во "влажную камеру", которой может служить, например, пластиковая коробка, дно которой устлано увлажненной фильтровальной бумагой. Все пробы инкубируют 1 ч при 37 °С. По окончании инкубирования пробы рассматривают в ярком свете. Стекло держат горизонтально, слегка наклоняя и встряхивая его. При этом легко заметно образование твердого геля или увеличение вязкости.

Критерием оценки результатов может служить вибрация капель: положительный результат – после инкубирования не наблюдается вибрации капли при постукивании по стеклу; отрицательный результат – капля вибрирует так же как и до инкубирования [5].

Оценивать результаты реакции можно и после высушивания реакционной смеси. Для этого после инкубирования стекло помещают на крышку кипящего стерилизатора и аккуратно нагревают до полного испарения капель на стекле. Это занимает 3–5 мин. Необходимо, чтобы влага испарилась полностью. После этого результаты теста оцениваются по следующим критериям: положительный – гомогенное белое пятно; отрицательный – образование центрального кольца [6]. Наблюдаемая картина объясняется следующим образом. При отрицательном результате ЛАЛ-реактив во время реакции собирается в центре капли, что при высушивании приводит к образованию центрального кольца. При положительном результате он распространяется равномерно по всей капле. Таким образом, образование геля приводит при высушивании к образованию гомогенного сухого пятна по всей капле. В некоторых пробах могут образовываться периферические кольца на месте центрального кольца, что признано за промежуточную реакцию. Само

по себе нагревание после завершения инкубирования не приводит к изменению результатов теста.

В другом варианте микрометода [7] реакционные смеси после инкубирования рассматривают под фазово-контрастным микроскопом при малом увеличении (×4). В отрицательном контроле фон – черный с большим числом ярких клеточных фрагментов, эти клеточные фрагменты имеют тенденцию агрегироваться и собираться к центру капли. Когда по стеклу постукивают пальцем, эти агрегированные фрагменты клеток начинают вибрировать. В реакционной смеси, содержащей эндотоксин, фон опалесцентный, как морозное стекло, клеточные фрагменты остаются диспергированными по всей капле и не вибрируют при ударе. Степень опалесценции фона пропорциональна концентрации эндотоксина. Для того чтобы получить более объективную картину, реакционную смесь окрашивают одной каплей раствора бромфенолового синего, накрывают покровным стеклом и визуально оценивают результат. В отрицательном контроле через несколько минут после окрашивания развивается характерное голубое кольцо около 5–6 мм в диаметре вдоль всего прежнего края капли реакционной смеси. По всему полю видны окрашенные фрагменты клеток. В реакционных смесях, содержащих эндотоксин, образовавшийся гель окрашивается и распределяется как "облако" по всему полю, а отдельных фрагментов клеток не видно. Сразу же после добавления красителя гелевая масса выглядит как белая "облакоподобная" масса, окруженная голубым красящим раствором. Через несколько минут она окрашивается красителем, и окружающая голубая окраска исчезает. Таким образом окрашенное "облако" является образованным под действием эндотоксина гелем. Такая "облачность" геля снижается пропорционально снижению концентрации эндотоксина. Образование "кольца" при отрицательной реакции, по-видимому, связано с высыханием и окрашиванием края капли в реакционной смеси, в которой вязкость ниже, чем в реакционной смеси с положительной реакцией.

Краситель не обязательно должен быть апирогенным, так как интервал между добавлением красителя и исследованием результатов составляет всего несколько минут. Поэтому маловероятно, что пирогенное загрязнение раствора красителя может вызвать гелирование ЛАЛ-реактива и влиять на результаты теста. Окрашенные препараты можно долгое время хранить в высушенном виде.

И, наконец, еще один вариант микрометода [3]. В этом методе для того чтобы капля реакционной смеси не растекалась по стеклу, на нем

делаются парафиновые кольца. Для этого нагретую стеклянную трубку диаметром 9 мм обмакивают в стерильный парафин и наносят кольцо на поверхность стерильного силиконированного стекла. В каждое кольцо помещают 10 мкл ЛАЛ реактива, к ним добавляют 10 мкл испытуемого раствора и перемешивают в кончике автоматической пипетки. После инкубирования во влажной камере стекло наклоняют на 45°, при этом в отрицательной пробе реакционная масса стекает к краю кольца, тогда как в положительной – остается неподвижной. После этого в центр капли вертикально опускают капиллярную трубку. Размеры капилляра – 75×1,5 мм. Реакционная смесь поднимается по капилляру на высоту, пропорциональную ее вязкости. Положительные пробы поднимаются на высоту до 4 мм, отрицательные – на высоту более 6 мм. Отрицательный контроль: может подняться на высоту 10–12 мм. Интервал от 4 до 6 мм считается промежуточной реакцией. Капиллярный метод считывания результатов требует меньшего опыта и применим для тестов, проводящихся на поверхности оборудования. В этом случае визуальное считывание может оказаться сложным.

Результаты микрометодов и теста в пробирках показывают полную корреляцию для отрицательных и положительных результатов [3]. Однако при их проведении могут возникать проблемы, которые обычно не возникают при проведении пробирочного гель-тромб теста. Например, очень гигроскопичные растворы проявляют тенденцию к увеличению объемов капли во время длительного инкубирования. Это может привести к уменьшению чувствительности теста. В этих случаях рекомендуется использовать ненасыщенную влажную камеру [4]. С другой стороны, из-за некоторого испарения, возможного во время инкубирования, объем реакционной смеси может уменьшаться, что также затрудняет оценку результатов [5]. С тем чтобы уменьшить испарение, стекло с реакционными смесями, помещенное во влажную камеру, накрывают крышкой чашки Петри. Это создаёт двойной слой изоляции. Если температура в камере поддерживается на уровне 37 °С, двойная изоляция предотвращает конденсирование на внутренней поверхности чашки Петри, сохраняя ее постоянную температуру [3]. Если использовать не силиконированные стекла, капля легко растекается по стеклу и теряет форму. Из-за этого оценка результатов может быть неточной. Очевидным достоинством микрометодов является возможность проводить анализ на присутствие пирогенов непосредственно на поверхности приборов и оборудования, которые должны быть апирогенны, конечно, если размеры этого оборудования позволяют поместить его в термостат. Но и в этом

случае он не всегда оказывается прост в проведении, как например, при оценке содержания эндотоксина на поверхности мембран, используемых в системах фильтрации. Мембраны должны быть свободны от видимой влаги, но достаточно влажными, чтобы избежать впитывания реагента. Гидратирование мембраны может привести к ее искривлению, что делает обычные методы считывания результатов теста непригодными. В этом случае можно использовать капиллярный метод [3].

Не столь существенны разногласия относительно объемов реактивов, используемых в этих методах. Считается, что более крупная капля (по 20 мкл лизата и испытуемого препарата) имеет более правильную форму и облегчает оценку результатов [5]. В то же время в тесте с окрашиванием используется всего по 7–8 мкл [7].

Несмотря на внешнюю простоту метода, в котором оценка результатов проводится по высушенным образцам, этот способ не лишен и недостатков. Так, при использовании в качестве испытуемого раствора препарата с высоким содержанием белка капли агрегируются и скатываются с силиконированного стекла во время высушивания смеси [6]. Использование проб с высокой концентрацией солей также может затруднять оценку результатов после высушивания образцов.

Все это заставляет вводить новые критерии оценки результатов и делает эту оценку более запутанной. Однако введение новых определений для результатов реакций можно считать общим недостатком этих микрометодов по сравнению со стандартным пробирочным тестом. Во всех этих "облаках", "центральных пятнах" и "кольцах" легко запутаться. Однако достоинства микрометода столь очевидны, что он уже включен в Фармакопею Италии (IX издание 1985). Объемы ЛАЛ-реактива и испытуемого раствора определены равными 10 мкл, время инкубирований – 60 мин во влажной камере. Результаты оценивают, наклоняя стекло на 45° и осторожно постукивая по нему. Если гель не разрушается при наклоне, значит реакция положительная.

При использовании микрометода стоимость количественного определения эндотоксина в образце снижается в 10 раз по сравнению со стандартным тестом в пробирках без ущерба чувствительности теста. Все это значительно расширяет круг использования ЛАЛ-теста.

Гель-тромб тест является наиболее подходящим для проведения анализа на пирогенность воды для инъекций и парентеральных растворов. Поэтому он включен в ряд Фармакопей как конечный тест. Важно отметить, что в Фармакопее США указывается, что двукратная ошибка считается приемлемой при проведении гель-тромб теста. В то же время

более сложные, инструментальные методы предполагают значительно меньшую ошибку, что считается преимуществом этих методов, например, 10 % – ошибка для хромогенного метода. Как ни парадоксально, но это означает, что пользователи гель-тромб теста имеют преимущества из-за большего права на ошибку во время подготовки и проведения анализа.

Развитие гель-тромб теста привело к созданию ряда количественных методик. Так, турбидиметрический тест основан на наблюдении, что увеличение концентрации эндотоксина приводит к пропорциональному развитию мутности, вызванному осаждением коагулогена из ЛАЛ-реактива [2, 8, 9]. Реагент для этого теста содержит коагулоген в количествах, достаточных для образования мутного раствора, но недостаточных для образования твердого геля при действии на лизат эндотоксина. После инкубирования, проводимого так же, как и для гель-тромб теста, пробы анализируют на спектрофотометре или нефелометре. Оптимальная длина волны – 360 нм. Возможно также измерение при длинах волн 380, 405, 670 нм [10]. Концентрация эндотоксина рассчитывается по калибровочной кривой, для построения которой проводится серия опытов с использованием различных разведений стандартного эндотоксина.

Одной из наиболее перспективных разновидностей турбидиметрического метода является кинетический тест. В этом методе также определяется степень помутнения раствора, однако в отличие от турбидиметрического метода измеряется значение степени помутнения не в одной конечной точке после остановки инкубирования, а в течение всего периода инкубирования. В основе этого метода лежит наблюдение, что скорость реакции между эндотоксином и ЛАЛ-реактивом находится в прямой зависимости от концентрации эндотоксина. Скорость реакции измеряется по степени помутнения реакционной смеси. По точкам, полученным в течение всего процесса инкубирования, строится кинетическая кривая изменения оптической плотности во времени. Чем выше концентрация эндотоксина, тем раньше начинается реакция (помутнение) и тем круче кривая активности. Примеры кинетических кривых для растворов эндотоксина в концентрациях от 1,0 до 0,03 э.ед./мл приведены на рис. 4.

Концентрацию эндотоксина определяют по калибровочным кривым. Необходимо отметить, что конечная степень помутнения зависит от содержания коагулогена в ЛАЛ-реактиве (другими словами, от количества субстрата для свертывающего фермента), а не от концентрации эндотоксина. От концентрации эндотоксина зависит скорость реакции, т.е. активность ферментной системы и скорость использования субстрата.

Поэтому в этом методе определения концентрации эндотоксина исключительное значение придается точному ограничению времени реакции и остановки инкубирования.

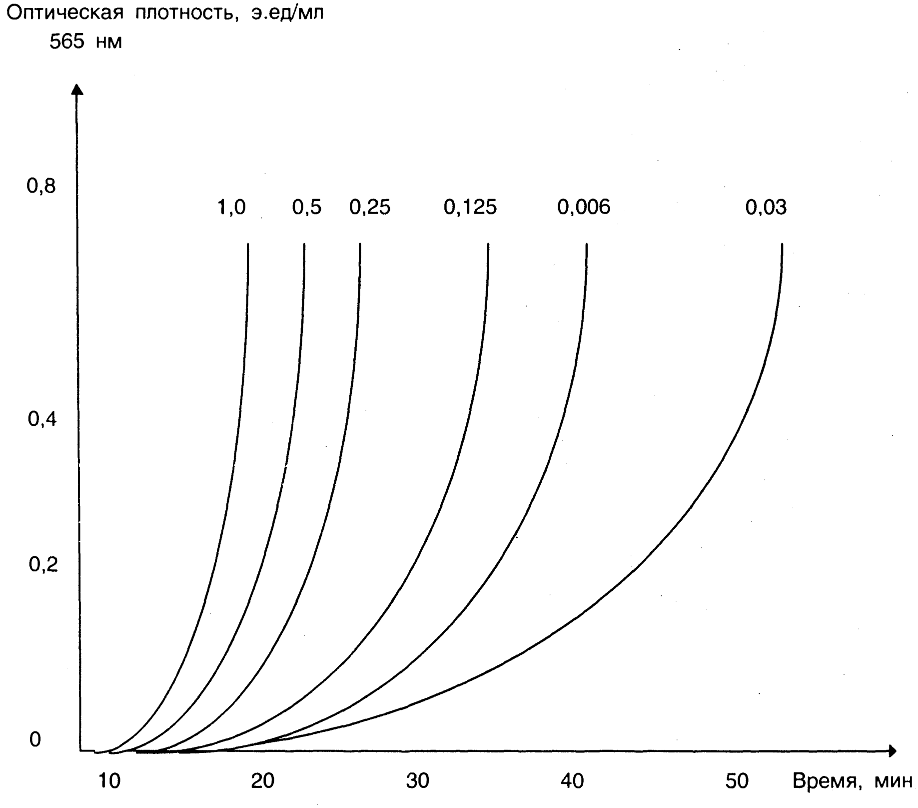

Рис. 4. Кинетические кривые растворов эндотоксина в концентрации 1-0,03 э.ед./мл

Для проведения кинетического ЛАЛ-теста созданы специальные приборы LAL 4 000 и LAL 5 000. Прибор LAL 4 000 состоит из блока, содержащего 21 источник нагревания, 20 пар диодов, испускающих свет (максимальная длина волны 560 нм), и фотодиодов, а также персонального компьютера, считывающего и обрабатывающего информацию. Анализ проводится в пробирках из боросиликатного стекла диаметром 12 мм и

высотой 75 мм. К испытуемому раствору объемом 0,4 мл добавляется 0.1 мл ЛАЛ-реактива. Оптическое считывание производится через каждые 5 с, всего 90 мин. Первые 135 с идет настройка прибора. После этого начинается отсчет. Температура 37 °С поддерживается с точностью ±0,5 °С. Прибор способен производить одновременно 20–40 определений (при использовании двух блоков). Прибор LAL 5 000, оснащенный блоками на 24 или 32 определения, позволяет при комбинировании 3 блоков делать до 96 определений одновременно. С помощью этих приборов определяется широкий спектр концентраций эндотоксина – от 100 до 0,01 э.ед./мл. В 1985 г. метод был рекомендован FDA для применения в фармацевтической промышленности [1].

Наиболее совершенной аппаратурой для проведения ЛАЛ-теста турбидиметрическим способом справедливо признан токсинометр Toxinometr ET-201, разработанный фирмой "Waro Pure Chemical Industries" (США). Прибор работает по тому же принципу, что и приборы LAL 4 000 и LAL 5 000. В него можно поместить одновременно 64 пробы. Отличительной особенностью этого токсинометра является возможность использования здесь пробирок диаметром 10 мм и высотой 75 мм, т.е. таких же, как и в гель-тромб тесте. Одинаков также и объем пробы – 0,1 мл испытуемого раствора и 0,1 мл ЛАЛ-реактива. Оптическая плотность определяется через каждые 12 с при длине волны 600 нм. Весь анализ длится 45 мин, а через 60 мин можно проанализировать пробирки с пробой по методу гель-тромб теста.

Таким образом, токсинометр можно использовать для проведения анализа как турбидиметрическим методом, так и методом гель-тромб теста, причем допустимо использование любого ЛАЛ-реактива. В 1987 г. FDA рекомендовало использование токсинометра ET-201 для контроля содержания эндотоксинов в лекарственных препаратах [11].

Метод хромогенного субстрата также количественный – спектрофотометрический. Он отличается от предыдущих тем, что коагулоген в нем полностью или частично заменен искусственным хромогенным субстратом. Обычно это тетрапептид, имеющий на С-конце хромофор ПНА. Биохимической основой разработки этого теста было определение точек разрыва коагулогена свертывающим ферментом. Свертывающий фермент разрезает коагулоген в 2 точках по связям $Арг_{18}$-$Тре_{19}$- и $Арг_{46}$-$Гли_{47}$; в обоих случаях аминокислотой, предшествующей разрезаемой связи, является глицин [12–14]. Наибольшее сродство свертывающий фермент проявляет к субстрату ТБОК-Лей-Гли-Арг-ПНА [13–16]. Во время активации свертывающий фермент действует как амидаза, разрезая

связь Арг-ПНА и высвобождая ПНА. В результате появляется желтая окраска, интенсивность которой пропорциональна концентрации эндотоксина в реакционной смеси. Результаты определяются спектрофотометрически при длине волны 405 нм [2, 17]. Для проведения теста сначала инкубируется ЛАЛ-реактив с пробой для активации ферментной системы, после чего добавляется хромогенный субстрат. Через определенный промежуток времени реакция останавливается добавлением уксусной кислоты. Некоторые варианты хромогенного метода допускают сочетание ЛАЛ-реагента и хромогенного субстрата при первом инкубировании [2].

В некоторых случаях, например при определении эндотоксина в сыворотке или плазме крови, на измерение поглощения при 405 нм может оказывать влияние желтый цвет сыворотки или плазмы. Для того чтобы избежать этого, высвобожденный ПНА можно перевести в азокраситель красного цвета методом диазотирования. Этот прием увеличивает чувствительность метода примерно в 2 раза. Используя набор Toxicolor test (Япония) для определения эндотоксина в крови, с помощью этого метода можно обнаружить эндотоксин в концентрации 1 пг/мл или 0,003 э.ед./мл.

Для хромогенного метода серьезным препятствием может оказаться конкурирующее ингибирование, вызванное присутствием коагулогена в ЛАЛ-реактиве. В таком случае свертывающий фермент преимущественно разрезает коагулоген, а не хромогенный субстрат, что естественно снижает чувствительность теста. Производители ЛАЛ-реактива обходят эту проблему либо путем разведения реагента, снижающего концентрацию коагулогена, либо путем отбора партий ЛАЛ-реактива, имеющих низкое содержание коагулогена. Существуют физические и химические методы удаления коагулогена, но они существенно увеличивают стоимость реактива [2].

В 1982 г. FDA рекомендовало хромогенный тест в качестве количественного метода определения содержания эндотоксина, проводимого по следующей методике. Испытуемая проба смешивается с ЛАЛ-реактивом и инкубируется 10 мин при температуре 37 °С. Затем добавляется раствор субстрата и смесь выдерживается при тех же условиях еще 3 мин, после чего реакция прекращается добавлением 25 % уксусной кислоты. Если эндотоксин присутствует, появляется желтое окрашивание, затем определяется оптическая плотность на спектрофотометре при длине волны 405 нм. Концентрация эндотоксина определяется по калибровочной кривой [1].

В колориметрическом тесте осаждаемый в результате реакции между ЛАЛ-реактивом и эндотоксином коагулоген после инкубации отделяется центрифугированием и отмывается от пробы и не прореагировавшего белка. После этого количество осажденного белка определяется по методу Лоури. Оптическая плотность окраски, развившейся в результате реакции, измеряется спектрофотометрически при длинах волн 500 или 700 нм. Так как количество осажденного белка пропорционально концентрации эндотоксина, можно построить калибровочную кривую с использованием стандартного эндотоксина и по ней определить концентрацию эндотоксина в пробе [18].

5.2. Условия проведения ЛАЛ теста, ложноположительные и ложноотрицательные результаты

Уже отмечалось, что наиболее распространенным способом проведения теста является гель-тромб тест. Поэтому имеет смысл остановиться, главным образом, на условиях проведения именно этого теста. Другие методики более сложны и, как правило, требуют наличия не только специального препарата, но и достаточно сложных приборов. Для проведения же гель-тромб теста никакие особые приспособления не нужны. Необходимы только водяная баня и сухожаровой шкаф для депирогенизации посуды. А в случае использования разовой стерильной и апирогенной посуды (пробирки, пипетки и др.) необходимость в сухожаровом шкафу отпадает.

При проведении любого теста необходимо учитывать возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Под ложноположительными результатами подразумевается получение положительного результата (т.е. регистрации содержания эндотоксина выше установленной нормы) при действительном низком содержании эндотоксина. Так, в случае контроля инъекционных лекарств ложноположительный результат подразумевает выбраковку препарата хорошего качества.

Ложноотрицательный результат теста – результат, при котором определенная с помощью ЛАЛ-теста концентрация эндотоксина ниже допустимой нормы при действительном содержании эндотоксина выше нормы, что может привести к введению пациенту пирогенного препарата. Обе эти возможности крайне нежелательны и поэтому параллельно с собственно тестом на определение содержания эндотоксина ставятся тесты, задачей которых является проверка корректности анализа.

Ложных результатов можно избежать при соблюдении условий проведения теста. Ниже приведены некоторые общие правила проведения ЛАЛ-теста и рассматриваются случаи обнаружения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Наиболее часто такие результаты получаются из-за пренебрежения правилами работы. Вся посуда, используемая при проведении теста, должна быть депирогенизирована нагреванием при температуре 180 °С как минимум 3 ч, или при 250 °С не менее 30 мин. При работе с ЛАЛ-реактивом, стандартом эндотоксина, а так же при приготовлении серии разведений эндотоксина или испытуемого раствора должна быть исключена возможность внесения дополнительных загрязнений, что может привести к искажению результатов теста. При разведении сублимационно высушенного ЛАЛ-реактива, стандарта эндотоксина и приготовлении любых разведений (эндотоксина или испытуемого раствора) необходимо использовать воду с низким содержанием эндотоксина (вода для ЛАЛ-теста). Такая вода не должна вызывать гелирования ЛАЛ-реактива после инкубирования.

Лиофилизированный ЛАЛ-реактив разводят установленным объемом воды и аккуратно перемешивают до полного растворения. Его можно использовать в течение суток. Препарат можно замораживать и хранить в таком виде 1 месяц. Повторное замораживание не допускается.

Если стандарт эндотоксина лиофильно высушен, его разводят необходимым объемом воды для ЛАЛ-теста и растворяют, активно встряхивая флакон. Разведенный препарат можно хранить при температуре 2–8 °С не более 4 недель. Замораживание раствора эндотоксина не допускается. Серии рабочих разведений не хранят, их готовят для каждого дня работы.

Оптимальное значение pH реакции 7,5. Рекомендуемый диапазон pH при проведении опыта 6,0-7,5. Это подразумевает необходимость контроля pH испытуемого раствора. В случае необходимости pH доводят до нормы добавлением стерильных апирогенных растворов 0,1 N HCl или 0,1N NaOH или апирогенного буфера. Некоторые фирмы-производители выпускают в качестве растворителя для лиофилизированного ЛАЛ-реактива апирогенный буферный раствор (трис-HCl, pH 7,4). В этот раствор добавляется индикатор феноловый красный. Изменение окраски реакционной смеси ЛАЛ-реактива и испытуемого раствора свидетельствует в таком случае о выходе за пределы допустимого диапазона pH и о возможности получения ложных результатов.

Сразу же после добавления в пробирку раствора эндотоксина и ЛАЛ-реактива реакционную смесь необходимо тщательно перемешать,

в противном случае можно получить ложноотрицательные результаты. Но перемешивание не должно вызывать пенообразования. Это может привести к денатурации белков ЛАЛ-реактива и так же ведет к получению ложноотрицательных результатов.

Пробирки с реакционной смесью помещают в водяную баню или термостат с температурой 37 °С. Уже отмечалось, что реакция между ЛАЛ-реактивом и эндотоксином зависит от температуры и времени реакции. Точное поддержание оптимальной температуры (37±1) °С необходимо при использовании любого метода проведения теста. Уменьшение температуры до 25 °С приводит к замедлению скорости реакции, повышение до 45 °С – к разрушению белков ЛАЛ-реактива. Исключительно важное значение имеет строгое соблюдение времени инкубирования. Для гель-тромб теста оно составляет (60±2) мин. Если параллельно ставится большое число тестов, надо быть уверенным, что каждый из них будет прекращен точно через указанный промежуток времени.

Важным условием инкубирования является отсутствие колебаний, вибрации и толчков реакционной смеси. Все это приводит к необратимому разрушению геля и получению ложноотрицательных результатов. Обычно для инкубирования используют водяную баню, которая дает наиболее равномерный нагрев.

Точно через 60 мин инкубирования пробирку вынимают из штатива. Нельзя вынимать штатив со всеми пробирками, нельзя ударять или встряхивать пробирки. Пробирки аккуратно переворачивают на 180°. В случае присутствия в пробе эндотоксина в достаточной концентрации образуется твердый гель, который не разрушается при переворачивании пробирки на 180°.

Все вышеперечисленные условия являются общими правилами проведения любого теста. Для определения достоверности теста, т.е. для гарантии того, что все требования, предъявляемые к условиям проведения теста, выполнены, ставится контроль: положительный, в котором смешивают ЛАЛ-реактив с эндотоксином, количество которого в 2 раза превышает заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива, и отрицательный контроль – ЛАЛ-реактив и апирогенная вода. Тест считается достоверным, если положительный и отрицательный контроль дали адекватные результаты в двух повторностях. Положительный ответ для отрицательного контроля свидетельствует о загрязнении эндотоксином ЛАЛ-реактива, воды или посуды. Отрицательный ответ в положительном контроле может указывать на плохое качество ЛАЛ-реактива или

эндотоксина, на несоблюдение условий инкубирования, выход за рамки pH и т.д. Такие ошибки легко распознаются и устраняются.

Однако на практике приходится сталкиваться с проблемами, связанными с природой испытуемого препарата, который может сам реагировать с ЛАЛ-реактивом, изменяя тем самым результаты его реакции с эндотоксином. В продукте могут содержаться вещества, вызывающие гелирование ЛАЛ-реактива помимо эндотоксина. Вещества, вызывающие неспецифическое гелирование, известны и описаны ранее в главе 3 ("Механизм реакции гелирования лизата амебоцитов"). При работе с ними необходимо учитывать возможность ложного гелирования.

Наиболее простым способом избежания ложноположительных результатов является разведение продукта, приводящее к выходу за рамки концентраций, вызывающих гелирование. Однако такое неспецифическое гелирование встречается нечасто, гораздо чаще продукт оказывает противоположное действие, ингибируя реакцию ЛАЛ-реактива и эндотоксина. Результаты теста в этом случае не отражают реального содержания эндотоксина в испытуемом растворе. Здесь ложноотрицательные результаты наиболее опасны, так как могут привести к разрешению использования пирогенного препарата. Ингибирование может иметь различную природу. Оно может быть вызвано связыванием катионов, необходимых для активации ферментной системы, денатурацией белка, изменением pH, адсорбцией эндотоксина [2]. Известно ингибирующее свойство крови, плазмы, сыворотки. В данном случае причиной являются антикоагулянты, содержащиеся в крови и плазме. Ингибиторами могут быть антибиотики, гормоны, алкалоиды, ферменты, простые сахара. Так же как и в случае с ложным гелированием ингибирующее действие можно снять разведением препарата до концентрации, при которой ингибирование исчезает, а концентрация эндотоксина остается в рамках чувствительности ЛАЛ-реактива.

Поэтому, прежде чем использовать ЛАЛ-тест для определения концентрации эндотоксина в продукте, необходимо убедиться в том, что сам продукт не ингибирует или не активирует реакцию ЛАЛ-реактива и эндотоксин. Для этого Фармакопеей США предусмотрено проведение специального теста (Enhancement/Inhibition test). В этом тесте сравнивают реакцию ЛАЛ-реактива с серией стандартных разведений эндотоксина водой и с таким же разведением эндотоксина испытуемым продуктом и самим продуктом. Например, при чувствительности ЛАЛ реактива 0,25 э.ед./мл можно использовать серию разведений эндотоксина водой и продуктом в ряду концентраций эндотоксина: 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 э.ед./мл.

Тесты проводятся в четырех повторностях для каждого разведения. Если результаты определения концентрации эндотоксина для серии его разведений водой и продуктом укладываются в пределы допустимой ошибки (т.е. отличаются друг от друга не более чем в два раза), считается, что продукт прошел тест на ингибирование или усиление реакции. Если результаты разные, например, отсутствие геля при разведении эндотоксина продуктом, или наоборот, гелирование при низких концентрациях эндотоксина – это говорит об ингибировании или усилении реакции. Тогда продукт разводят водой и повторяют тест, используя уже это разведение. Так находят степень разведения продукта, при котором исчезают его активирующие или ингибирующие свойства. Начиная с этого разведения продукт можно использовать в тесте на определение содержания эндотоксина. Важно отметить, что при проведении этого теста препарат не должен содержать своего эндотоксина в концентрации, вызывающей гелирование ЛАЛ-реактива, в противном случае тест на ингибирование/усиление оказывается недействительным. Для этого и ставится проба ЛАЛ + продукт (продукт в той концентрации, которая используется для разведения эндотоксина). Если эндотоксин присутствует, его концентрацию необходимо снизить разведением либо удалить каким-либо способом, например ультрафильтрацией.

Уже отмечалось, что усиление реакции встречается редко, гораздо чаще имеет место ингибирование. Для того чтобы быстро определить степень разведения продукта, при которой исчезает ингибирование, рекомендуется проводить предварительный тест для обнаружения ингибирования. Для этого проводится параллельное тестирование разведения продукта водой и разведения продукта раствором эндотоксина. Концентрация эндотоксина по мере снижения концентрации продукта должна оставаться постоянной. Она должна гарантировано вызывать гелирование ЛАЛ-реактива в случае отсутствия ингибирования. Рекомендуется добавлять эндотоксин в концентрации равной 2λ (в 2 раза большей чувствительности ЛАЛ-реактива). Сначала в тесте проверяют несколько десятикратных разведений продукта. В случае ингибирования несколько первых разведений могут не дать геля. Первое разведение, дающее гель, свидетельствует о степени разведения, необходимой для преодоления ингибирования. Далее тест продолжают, используя уже серию двукратных разведений в ряду, на который указывают результаты предварительного теста. Таким образом, этот тест позволяет определить степень разведения, необходимую для преодоления ингибирования, но он не дает никакой информации о возможности усиления реакции

и поэтому может использоваться только как средство выбора правильного разведения продукта для проведения USP Enhancement/Inhibition test.

Метод разведения продукта наиболее часто используется и для определения концентрации эндотоксина и для преодоления ингибирования реакции продуктом. Однако степень разведения должна контролироваться. Максимальное разведение препарата, которое может быть осуществлено без утраты достоверности ЛАЛ-теста, определяется по уравнению:

$$P = \frac{K}{\lambda \cdot M},$$

где P – разведение; λ – чувствительность лизата; K – максимальное количество эндотоксина, которое человек может получить при данном способе введения без развития патологических изменений; M – максимальная доза препарата на 1 кг массы тела в 1 ч.

Например, раствор для инъекций содержит 20 мг/мл вещества X. Максимальная доза для человека 25 мг·мл$^{-1}$·ч$^{-1}$, что соответствует 1,25 мл (M) раствора с концентрацией 20 мг/мл. Чувствительность лизата – 0,06 э.ед./мл. Препарат будет вводиться внутривенно, следовательно K = 5 э.ед.·кг$^{-1}$·ч$^{-1}$

$$P = \frac{5}{0{,}065 \cdot 1{,}25} = 61{,}5.$$

Таким образом, максимально допустимое разведение раствора препарата X равно 1:61,5. В этой формуле изменено может быть только значение чувствительности ЛАЛ-реактива (λ). Выбрав более чувствительный препарат, можно увеличить максимально допустимое разведение.

После подтверждения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива и проверки ингибирования можно проводить собственно ЛАЛ-тест для принятия решения о разрешении или запрещении использования испытуемого препарата или для определения концентрации в нем эндотоксина. Для решения о разрешении или запрещении использования препарата его можно проверять в одном разведении, при котором тест должен быть отрицательным. Для определения концентрации эндотоксина в продукте готовят серию разведений препарата, которая не должна выходить за рамки допустимого максимального разведения. Полученные результаты используют для расчета содержания эндотоксина.

Так как при проведении ЛАЛ-теста возможны некоторые отклонения, зависящие от уровня подготовки персонала и качества используемых

реагентов и оборудования, для каждой лаборатории, которая использует ЛАЛ-тест в качестве официального теста, до начала проведения официальных тестов проводится проверка уровня подготовки персонала лаборатории. Каждым работником должны быть проведены от 4 до 28 анализов, в которых должна использоваться одна партия ЛАЛ-реактива и одна партия CSE. Проводится тест по методике установления заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива. В тесте используют серию двукратных разведений стандарта эндотоксина, перекрывающую чувствительность ЛАЛ-реактива. Тест проводится в 4 повторностях для каждого разведения. После инкубирования результат, полученный для каждой пробирки, оценивается как положительный или отрицательный. Тест считается действительным, если значение для 4 повторностей находится в пределах допустимой ошибки. Если ошибка выше, тест может быть повторен и ошибка рассчитывается уже для 8 повторностей, и так до 28 тестов. Если после проведения в 28 повторностях ошибка все же выше предела, соответствующего 28 тестам, тест считается недействительным.

Прежде чем повторять этот тест, необходимо выяснить причины ошибки, приводящей к разбросу результатов.

Список литературы

1. Hochstein H.D. // Pharmaceutical Technology. – 1987. – Vol. II. – N 6. – P. 158—163.
2. Novitsky T.J. // LAL Update. – 1983. – Vol. 1. – N 1. – P. 1.
3. Flowers D.J. // Med. Lab. Sci. – 1979. – Vol. 36. – N 2. – P. 171–176.
4. Frauch P. // J. Pharmacol. Sci. – 1974. – Vol. 63. – P. 808–809.
5. Goto H. et al. // Jpn. J. Exp. Med. – 1977. – Vol. 47. – N 6. – P. 524.
6. Goto H., Nacamura S. // Jpn. J. Exp. Med. – 1979. – Vol. 49. – P. 19–25.
7. Okuguchi S. // Microbiol. Immunol. – 1978. – Vol. 22. – P. 113–121.
8. Levin J., Bang F. B. // Bull. John Horkins Hosp. – 1964. – Vol. 115. – N 3. – P. 265–274.
9. Levin J., Bang F. B. // Thromb. Diath. Haemorrh. – 1968. – Vol. 19. – N 1–2. – P. 186–197.
10. Elin R.J., Wolff S.M. // J. Infect. Dis. – 1973. – Vol. 128. – N 3. – P. 349–352.
11. Sullivan J.D., Watson S.W. // Apll. Microbiol. – 1974. – Vol. 28. – N 6. – P. 1023–1026.
12. Nacamura T., Morita T., Iwanaga S. // Eur. J. Biochem. – 1986. – Vol. 154. – N 3. – P. 511–521.
13. Morita T. et al. // Proteinase inhibitors: Medical and biological aspects. – Ed.N. Katsunuma, H. Umezawa, H.Holzer: Japan Soi. Soc. Press, Tokyo / Springer-Verlag, Berlin, 1983. – P. 229–241.
14. Morita T. et al. // Prog. Clin. Biol. Res. – Vol. 189.: Bacterial endotoxins: Structure, biomedical singnificance, and detektion with the Limulus amebocyte lysate test. – Alan R.Liss. Inc., N.-Y., 1985. – P. 53–64.
15. Iwanaga S. et al. // Bacterial endotoxins: Chemical, biological and clinical aspects. – Verlag Chemie, Heidelberg, 1984. – P. 365–382.
16. Nacamura T. et al. // J. Biochem. – 1977. – Vol. 81. – N 5. – P. 1567–1569.
17. Iwanaga S. et al. // Haemostasis. – 1978. – Vol. 7. – N 1. – P. 183–188.
18. Nandan R., Brown D.R. // J. Lab. Clin. Med. – 1977. – Vol. 89. – P. 910–918.

6. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛАЛ-ТЕСТА

6.1. Применение ЛАЛ-теста в фармацевтической промышленности

Применение ЛАЛ-теста в фармацевтической промышленности можно разделить на 2 большие области: использование ЛАЛ-теста для контроля технологических процессов и для контроля готовой продукции. Получить апирогенный продукт, а это одно из основных требований, предъявляемых к инъекционным препаратам, можно лишь при правильной организации всего технологического процесса получения лекарства, в частности, при организации постадийного контроля на содержание пирогенов. Поскольку изготовление инъекционных препаратов должно производиться максимально быстро, ЛАЛ-тест на сегодняшний день – единственный способ проведения постадийного контроля. Наиболее рациональные точки контроля при изготовлении инъекционных препаратов следующие: контроль сырья; контроль воды для инъекций; проверка элементов фильтра на вымывание из них пирогенов; контроль растворов перед стерилизующим фильтрованием; контроль чистоты ампул, флаконов.

Кроме того, ЛАЛ-тест эффективен при установлении причин в случае обнаружения пирогенов в конечном продукте. С успехом используется ЛАЛ-тест и для отработки режимов технологического оборудования. Так, для определения оптимальных режимов мойки ампул и флаконов в моечных машинах различного типа в тару вводят модельные загрязнения – эндотоксин (в количестве 25 э.ед.) и методом гель-тромб теста определяют содержание эндотоксина в ампулах, вымытых по различным режимам. В качестве положительного контроля используют немытые ампулы, в качестве отрицательного –

тару, прошедшую термическую депирогенизацию [1]. В свою очередь, режимы термической депирогенизации могут быть определены и проконтролированы с помощью ЛАЛ-теста [2]. Методики проведения ЛАЛ-теста для описанных выше случаев, а также конкретные величины допустимого значения эндотоксина не регламентируются государственными контролирующими организациями, а определяются производителями продукции. Поэтому внедрение этих методик не требует длительного времени и быстро приносит экономический эффект. Так, многолетнее использование ЛАЛ-теста в процессе производства лекарственных препаратов позволило повысить качество лекарств при удешевлении контроля. Фирма "Boehringer Mannheim" (Германия) сообщила, что введение ЛАЛ-теста позволило сэкономить 1 100 кроликов, ликвидировать 280 мест для их содержания и в 2 раза уменьшить затраты на питание. На фирме "Hause Hoechst" (Германия) экономия составила 500 мест и 1 000 животных.

Значительно сложнее обстоит дело с контролем готовой продукции, поскольку он проводится в четком соответствии с требованиями Фармакопеи или других регламентирующих документов, утверждённых государственными или международными организациями.

Впервые официально ЛАЛ-тест признан в 1980 г. в США, где в Федеральном регистре было опубликовано руководство по его применению в контроле медицинских и ветеринарных препаратов. Там сообщалось, что 0,1 нг/мл эндотоксина, введённый в 10 мл на 1 кг массы кролика, вызывают минимальный пирогенный эффект у 50 % кроликов. Исходя из этого, предел допустимого содержания эндотоксина в парентеральных препаратах составил 0,5 нг/мл.

Обобщение опыта практического применения ЛАЛ-теста в контроле лекарств, а также дискуссия, прошедшая в научной литературе по этому вопросу, привели к тому, что в тех Фармакопеях, которые допускают использование ЛАЛ-теста, он не заменяет полностью определения пирогенности на кроликах, а является самостоятельным тестом под названием "Бактериальные эндотоксины". Одной из причин этого является то, что не всегда прослеживается чёткая корреляция между ЛАЛ-тестом и определением пирогенности на кроликах [3, 4]. Определённо можно сказать лишь то, что содержание эндотоксина в количествах меньше 5 э.ед./кг всегда приводит к отрицательной реакции у кроликов, а в количествах более 50 э.ед./кг – к положительной [5]. В табл. 2 приведено сравнение двух методов анализа [4].

Таблица 2

Препараты, испытанные посредством ЛАЛ-теста на кроликах

Препарат	Количество проб	Количество проб с положительной реакцией		Доза для кролика, мл/кг
		ЛАЛ-тест	Тест на кроликах	
Нормальный сывороточный альбумин, 5 %	37	1	3	10
Нормальный сывороточный альбумин, 25 %	25	7	0	10
Белковая фракция плазмы (человека)	12	0	0	3
Иммуноглобулин сыворотки (человека)	8	4	0	10
Сыворотка против бешенства	8	1	1	1
Криопреципитатный антигемофилический фактор	5	4	1	3
Вирусные вакцины	26	22	17	1
Радиоактивные и желудочно-кишечные лекарственные препараты	27	9	7	1-5
Разнообразные лекарственные препараты	11	2	0	1
Всего	155	50	29	1-5

Кроме того, введению в частную фармакопейную статью теста "Бактериальные эндотоксины" должна предшествовать экспериментальная работа, доказывающая возможность применения этого испытания в данном конкретном случае. И, наконец, для того чтобы этот тест был принят Фармакопеей для препарата, где уже есть определение на кроликах, необходимо доказать, что он обеспечивает большую безопасность препарата для пациента или обладает другими существенными преимуществами.

Впервые ЛАЛ-тест включён в Фармакопею в 1980 г. в США (XX изд.). С 1995 г. в США действует Фармакопея XXIII изд., где также есть статья "Бактериальные эндотоксины". В статье приводится подробное описание методики проведения ЛАЛ-теста и предписывается его проведение лишь в тех случаях, когда это определено частной фармакопейной статьёй, где и приводится предел допустимого содержания эндотоксина в препарате. Более 30 частных статей Фармакопеи США включают показатель "Бактериальные эндотоксины". Это вода для

инъекций, используемая для приготовления инъекционных растворов, подвергающихся стерилизации в потребительской таре. Допустимое содержание эндотоксинов в ней не более 0,25 э.ед./мл. Такой же предел у стерильной воды для инъекций, предназначенной для растворения или разведения инъекционных препаратов и выпускающиеся в потребительской таре вместимостью не более 1 л. Оба эти препарата не содержат каких-либо добавок. Бактериостатическая вода для инъекций, содержащая одно или более противомикробное вещество, а также стерильная вода для инъекций могут содержать эндотоксинов не более 0,5 э.ед./мл. Многие фармакопейные статьи посвящены радиофармацевтическим препаратам. Для препаратов, вводимых интратекально, допустимый предел содержания эндотоксинов не более 14/V э.ед./мл (индия-III пантотетат, иттербия-196 пантотетат), где V – максимальный объём вводимого раствора. Когда радиофармацевтический препарат вводится внутривенно, содержание эндотоксина может быть не более 175/V э.ед./мл. В 1985 г. вышла в свет фармакопея Италии IX, где также присутствует статья “Определение бактериальных эндотоксинов”. Здесь максимально допустимая концентрация эндотоксинов (С), выраженная в эндотоксинных единицах в 1 мл, определяется по формуле: С= К/М (где К – максимальное количество эндотоксина, которое человек может получить при данном способе введения без развития патологических изменений; М – максимальная доза препарата в час). ЛАЛ-тест включён также в Европейскую фармакопею.

Большую работу по внедрению ЛАЛ-теста проводит FDA. В выпускаемых этим Управлением рекомендациях сформулированы требования по допустимому содержанию эндотоксинов в лекарственных препаратах: 5 э.ед.$\cdot$кг$^{-1}\cdot$сут$^{-1}$ для внутривенных препаратов и 0,2 э.ед.$\cdot$кг$^{-1}\cdot$сут$^{-1}$ для интратекально вводимых препаратов. Внутривенные растворы большого объёма могут содержать не более 0,5 э.ед./мл.

В 1983 г. FDA установило предел содержания эндотоксинов в смывах с медицинских аппаратов, соприкасающихся с кровью, составляющий 0,5 э.ед./мл. Исключение составляет аппаратура, контактирующая со спинномозговыми жидкостями, где допустимый предел 0,06 э.ед./мл. Приведённые величины относятся к пациенту с массой 70 кг. Кроме этого FDA публикует списки препаратов, для которых определён предел содержания эндотоксинов. В табл. 3 приведены примеры из этих списков. Допустимое содержание эндотоксинов пересчитано на 1 мг вещества.

Таблица 3

Пределы допустимого содержания эндотокинов в инъекционных препаратах, пересчитанные на 1 мг вещества

Препарат	Содержание эндотоксина, э.ед./мг	Препарат	Содержание эндотоксина, э.ед./мг
Ампициллина натриевая соль	0,25	Лидокаина гидрохлорид	1,10
Амфотерицин В	2,50	Лидокаина гидрохлорид	1,10
Аскорбиновая кислота	0,20	Магния сульфат	0,09
Гентамицина сульфат	0,50	Папаверина гидрохлорид	2,90
Дексаметазона ацетат	21,74	Фибриноген	0,17
Дигитоксин	111,00	Цистеин	0,70
Кальция глюконат	0,02	Эрготамина тартрат	357,00
Карбенициллин	0,025	Эфедрина сульфат	6,70
Кофеин	0,63		

Следует отметить, что во всех странах, где тест "Бактериальные эндотоксины" включён в Фармакопею или планируется его включить в ближайшем издании, разработка показателей этого теста для конкретных препаратов ведётся в одинаковой очерёдности. Так, в первую очередь устанавливается допустимый предел содержания эндотоксинов в радиофармацевтических препаратах, во вторую – для лекарств, которые нельзя испытывать на кроликах (наркотики, седативные средства) и в последнюю очередь для веществ, не вводимых внутривенно.

6.2. Применение ЛАЛ-теста в клинической практике

ЛАЛ-тест представляет интерес не только для фармацевтической промышленности. Большие надежды связываются с возможностью применения этого теста в клинической практике для ранней диагностики заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями. Обладая высокой чувствительностью и специфичностью по отношению к эндотоксинам грамотрицательных бактерий, ЛАЛ-тест, хотя и не даёт возможности идентифицировать конкретного возбудителя заболевания, однако позволяет выявить наличие или отсутствие бактерий или их эндотоксинов в жидкостях тела. Малое время, требующееся для

проведения реакции, даёт ЛАЛ-тесту большие преимущества по сравнению с посевом культуры. В ряде случаев важно не столько точное определение возбудителя инфекции, сколько установление факта её существования. Быстрая и надёжная идентификация грамотрицательной инфекции позволяет раньше начать лечение и правильно выбрать его стратегию и тактику.

Первой работой, касающейся проблемы определения эндотоксинов в крови, была работа Левина с соавторами. [6]. В ней отмечалось, наряду с важностью вопроса ранней диагностики, что в крови содержится ингибитор, блокирующий реакцию между ЛАЛ-реактивом и эндотоксином и затрудняющий точное определение содержания эндотоксина в крови. Авторы продемонстрировали, что ингибирующее действие крови может быть отчасти или полностью устранено предварительной экстракцией её хлороформом.

К настоящему времени клиническому применению ЛАЛ-теста посвящены сотни публикаций, что безусловно свидетельствует о важности проблемы. В данном разделе обсуждаются вопросы обнаружения эндотоксинов в различных жидкостях тела, проблемы, создаваемые ингибитором, находящимся в крови, и возможности его устранения.

Ряд исследований посвящён возможности обнаружения эндотоксина в крови или плазме при подозрении на сепсисы, бактериемию и/или септицемию. Установлено, что при грамотрицательной септицемии лихорадка возникает у пациентов при концентрации эндотоксина в крови, равной 3–4 пг/мл [7, 8]. Существующие в настоящее время методы определения эндотоксина в крови позволяют обнаружить эндотоксин в концентрации 1 пг/мл, что теоретически делает возможной раннюю диагностику заболеваний. Модельные опыты, в которых к плазме здоровых доноров добавляли очищенный эндотоксин, показали, что его количество может быть определено с большой степенью точности [9]. Необходимость быстрой диагностики бактериемии и/или септицемии можно продемонстрировать следующим примером: по данным Медицинского центра Амстердама, смертность для группы из 339 больных, перенёсших хирургическое вмешательство, составляла 27 %. В 64 % случаев причиной смерти была эндогенная бактериальная инфекция в основном грамотрицательными микроорганизмами [10]. Результаты применения ЛАЛ-теста для диагностики бактериемии или септицемии у послеоперационных больных показывают хорошую корреляцию с ростом посевов культуры: 75 % для положительных и 98 % для отрицательных тестов. Эти результаты предполагают, что ЛАЛ-тест может быть использован

как быстрый и надёжный метод для раннего обнаружения эндотоксинов в крови у пациентов, перенёсших хирургические операции [11]. Кроме того, было показано значительное увеличение содержания эндотоксинов в крови по показателям ЛАЛ-теста перед летальным исходом, тогда как выздоровление сопровождалось значительным снижением этих показателей. Следовательно, ЛАЛ-тест может явиться методом мониторинга состояния пациентов с грамотрицательными сепсисами, позволяющим своевременно вносить коррективы в метод лечения [12].

Необходимо отметить, что результаты ЛАЛ-теста не всегда хорошо коррелируют с результатами посева культуры. В связи с этим некоторые исследователи отмечают недостаточную надёжность ЛАЛ-теста как метода диагностики. Критическая оценка метода необходима, но при этом нужно учитывать, что в большинстве случаев главным методом оценки результативности ЛАЛ-теста является посев. Такое сравнение нельзя считать абсолютно адекватным, потому что присутствие бактерий в крови явление непродолжительное, эндотоксины же могут оставаться в крови и после гибели продуцирующих их бактерий. На результаты ЛАЛ-теста при обнаружении эндотоксинов серьёзное влияние также может оказать присутствие ингибитора в крови. Трудно точно указать его природу. По всей вероятности ингибитор не один, так как кровь является многокомпонентной системой, в которой присутствуют факторы коагуляции и антикоагулянты. Выше уже отмечалось сходство факторов коагуляции мечехвостов и млекопитающих, поэтому можно ожидать, что антикоагулянты крови способны блокировать реакцию между ЛАЛ-реактивом и эндотоксином. Возможны также и другие варианты, например связывание эндотоксина белками крови. Так или иначе, ингибитор присутствует в крови и затрудняет обнаружение эндотоксина. Существующие методы устранения ингибитора – экстракция хлороформом, гель-фильтрация, сочетание нагревания с разбавлением пробы являются вполне приемлемыми. Однако сама необходимость дополнительных манипуляций с кровью перед анализом чревата опасностью внесения дополнительного загрязнения и может усложнить количественное определение эндотоксина в крови.

Необходимо отметить, что определение эндотоксина нельзя проводить в сыворотке, так как при свёртывании происходит связывание эндотоксина, после чего уже невозможно провести точное определение его концентрации. Поэтому определение обычно проводят в плазме, однако возможно, что эндотоксин может быть связан с поверхностью тромбоцитов. В этом случае определение его концентрации в бесклеточной

плазме не будет отражать реального содержания эндотоксина в крови. Таким образом, результаты применения ЛАЛ-теста для обнаружения эндотоксинов в крови не считаются абсолютно надёжными для диагностики бактериемии и септицемии. Однако можно рассчитывать, что в процессе дальнейшего совершенствования методики проведения ЛАЛ-теста надёжность его будет возрастать.

Значительно большая надёжность при обнаружении эндотоксина в жидкостях тела менее сложных, чем кровь или плазма, например в спинномозговой жидкости, моче и т.д. Впервые возможность обнаружения грамотрицательных бактерий и их эндотоксинов в спинномозговой жидкости при подозрении на менингит, вызванный этими бактериями, определена в 1973 г. [13]. Уже тогда отмечалась высокая надёжность теста для такого определения. Возможность быстрого получения результатов и их надёжность позволяют сразу начинать лечение специфическим антибиотиком, избегая применение препаратов широкого спектра. С тех пор этому вопросу было посвящено большое число работ, в которых подтверждается пригодность теста для диагностики менингита, вызванного грамотрицательными бактериями, причём этот метод может быть более надёжным, чем окраска по Граму [8]. К этому можно добавить, что применение данного метода может простираться и дальше начальной диагностики заболевания, позволяя осуществлять контроль за его течением.

Результаты работ по определению эндотоксинов в моче показывают, что ЛАЛ-тест является надёжным и быстрым методом диагностики бактериурии, причиной которой в большинстве случаев являются грамотрицательные микроорганизмы. Бактериурия считается клинически значимой, когда в моче содержится более 10 бактерий/мл [14]. Исследования образцов мочи проводят в настоящее время бактериологическими методами, которые требуют как минимум 18–24 ч для получения количественных результатов. Учитывая продолжительность нормального посева, в клиниках и амбулаториях желательно иметь простой и быстрый метод для обнаружения клинически значимой бактериурии [14]. ЛАЛ-тест отвечает этим требованиям, поскольку имеет высокую степень чувствительности и специфичности. Количественные результаты позволяют дифференцировать пробы, содержащие более 10 бактерий/мл от содержащих менее 10 бактерий/мл. Время получения результатов – менее 1 ч, что также является важным фактором эффективного скрининга заболеваний [14]. Важно отметить, что анализ мочи с помощью ЛАЛ-теста не требует специальной обработки пробы,

кроме разбавления, а простота проведения анализа и легко читаемые результаты не требуют специальной подготовки персонала. ЛАЛ-тест, возможно, не заменит других, более распространённых методов, но он позволяет клиницистам и исследователям надёжно диагностировать грамотрицательную бактериурию [8, 14, 15].

ЛАЛ-тест с успехом используется для диагностики гонореи в цервикальных и уретральных экссудатах. Результаты клинических исследований показывают, что его диагностическая ценность (надёжность, чувствительность, специфичность) сравнима с посевом культуры [16]. При этом отмечается, что поскольку гонококки являются автолитическими организмами, при посеве и интерпретации результатов требуется достаточно высокая квалификация персонала [8]. Для проведения ЛАЛ-теста не требуется специальных условий и особой подготовки. Очень важным преимуществом этого теста является весьма короткое время его проведения. Так, для получения результатов при проведении теста хромогенным методом требуется всего 10 мин. Таким образом, ЛАЛ-тест может быть простым, быстрым и надёжным методом диагностики гонореи [16].

Применение ЛАЛ-теста для анализа соскобов со стекловидного тела и роговицы показывает, что ЛАЛ-тест не даёт ложноотрицательных результатов. Таким образом, степень предсказания в случае получения положительного результата равна 100 %. Более того, специфичность теста также равна 100 %, т.е. если нет грамотрицательных микроорганизмов, результат теста также отрицателен. Преимущества ЛАЛ-теста по сравнению с окраской по Граму делают его быстрым, надёжным индикатором инфекций роговицы и стекловидного тела, вызванных грамотрицательными бактериями [8].

Таким образом, надёжная диагностика с помощью ЛАЛ-теста заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями, представляется возможной сегодня в следующих жидкостях тела: спинномозговой, моче, уретральном и цервикальном секретах, в глазных экссудатах.

Можно ожидать, что с развитием методов проведения теста, получением новых более совершенных ЛАЛ-реактивов станет возможным более широкое применение этого теста в клинической практике. Преимущества этого теста перед многими другими существующими сегодня методами диагностики бактериальных заболеваний очевидны: относительная простота анализа, невысокая стоимость, надёжность и быстрота получения результатов, специфичность и высокая чувствительность к эндотоксинам грамотрицательных бактерий.

6.3. Расширение сферы применения ЛАЛ-теста

В настоящее время сфера применения ЛАЛ-тест не ограничивается только контролем качества лекарственных препаратов и диагностикой заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями. Он может быть использован в качестве средства обнаружения бактерий или эндотоксинов в самых разных средах. Цели этого обнаружения могут быть также самыми различными: от оценки бактериальной загрязненности среды до оценки количества органических примесей в особо чистой воде. Ниже приводятся некоторые примеры такого использования ЛАЛ-теста в различных областях.

Использование ЛАЛ-реактива для контроля качества лекарств, вводимых человеку, может быть легко перенесено на контроль ветеринарных препаратов и на диагностику заболеваний животных, вызванных грамотрицательными бактериями. Животным вводится большое количество самых различных парентеральных препаратов, среди которых вакцины для диагностических целей, пассивной и активной иммунизации; лекарства для лечения или предотвращения заболеваний, для гормональной синхронизации, седативные, обезболивающие средства и т.д. Требования к контролю качества этих лекарств мало отличаются от требований, предъявляемых при контроле качества лекарств, вводимых человеку. Это объясняется, с одной стороны, тем, что многие препараты, приготовленные для человека, применяются и для животных, с другой стороны, тем, что качество производства ветеринарных препаратов находится на таком же уровне, что и производство лекарств для человека. Поэтому принято считать, что чувствительность разных видов животных к эндотоксинам грамотрицательных бактерий равняется чувствительности человека. Хотя на самом деле чувствительность различных видов животных к эндотоксинам различна. По степени чувствительности некоторые виды животных можно расположить следующим образом: лошадь–коза–свинья–кошка–собака–овца–корова–крыса, наибольшей чувствительностью обладает лошадь. Расчеты допустимого уровня содержания эндотоксина в препаратах проводятся так же как и для человека. При этом только необходимо учитывать возможность введения больших, чем человеку доз препарата.

Примером диагностического использования ЛАЛ-теста в ветеринарии может служить его применение для диагностики мастита у коров, вызванного грамотрицательными бактериями. Такая диагностика может оказаться весьма полезной с точки зрения правильного выбора

антибиотика. Так по статистическим данным (Швеция) в 70-80 % случаев мастит вызывается грамположительными бактериями чувствительными к пенициллину (Streptococci и Staphylococcus aureus) и в 20 % случаев мастит вызван грамотрицательными бактериями, в основном E. coli [17].

Широкое применение ЛАЛ-тест находит в производстве, связанном с переработкой сельскохозяйственной продукции, где он может использоваться для контроля бактериологического качества сырья и готовой продукции. Например, в современном производстве диетических продуктов сырое молоко может храниться несколько дней при температуре 4 °С до начала обработки. При таких условиях могут размножаться холодолюбивые грамотрицательные бактерии (Pseudomonas putida), которые продуцируют термостабильные протеиназы и липазы. Эти ферменты сохраняют свою активность после нагревания и могут снижать качество продукта, вызывая его свертывание или изменяя его вкус. ЛАЛ-тест может использоваться в качестве быстрого и надежного способа обнаружения грамотрицательных бактерий в сыром молоке для предупреждения нежелательных отклонений в качестве готового продукта [18].

На многих фабриках, связанных с переработкой сельскохозяйственной продукции, ЛАЛ-тест используется для контроля содержания эндотоксинов и грамотрицательных бактерий в воздухе. Так, например, установлено, что многие профессиональные заболевания работников сельскохозяйственного сектора связаны с действием взвешенной в воздухе органической пыли, содержащей различные токсические продукты микробного происхождения. Особенно это касается птицефабрик, фабрик по переработке хлопка, боен и т.д. Развитие аллергических респираторных заболеваний связано с ингаляцией взвешенных в воздухе ЛПС грамотрицательных бактерий. Ингаляция воздушных ЛПС может приводить к таким проявлениям как кашель, головная боль, диарея и лихорадка. Причиной пневмокониоза среди рабочих хлопковых фабрик считается присутствие ЛПС грамотрицательных бактерий в хлопковой пыли. Концентрация ЛПС в воздухе равная 0,1–0,2 мкг/м^3 считается критическим уровнем для нарушения функции легких.

Таким образом, для оценки уровня загрязненности и степени опасности необходим анализ пыли на содержание ЛПС. В качестве надежного и селективного метода измерения концентрации ЛПС в пыли может быть использован ЛАЛ-тест. Взвешенную в воздухе органическую пыль с помощью специальных воздухозаборников собирают на фильтры, например на фильтры из ацетата целлюлозы с размером пор 0,8 мкм.

После определения общей массы пыли ее вымывают апирогенной водой, затем элюат исследуют с помощью ЛАЛ-теста [19].

Выше уже отмечалось, что ЛАЛ-тест идеально подходит для контроля содержания эндотоксинов в воде для инъекций. Но этот тест может быть использован и для оценки санитарного состояния питьевой воды и косвенного определения содержания в ней бактерий. В настоящее время единственным приемлемым способом оценки санитарного состояния воды является бактериологический тест. Существенным недостатком этого теста является значительное время, требуемое для получения результатов (24–48 ч). Установлено, что концентрация эндотоксинов в проточной воде, определяемая с помощью ЛАЛ-теста, хорошо коррелирует с ростом грамотрицательных бактерий. Поэтому ЛАЛ-тест как быстрый и простой способ оценки бактериологического качества воды может иметь много областей применения, особенно в критических ситуациях, таких как наводнения, ураганы, аварии в системах водоснабжения [20].

ЛАЛ-тест оказался полезным и при исследовании экологии микроорганизмов в океанической воде и оценки их биомассы. Измерение уровня ЛПС с помощью ЛАЛ-теста может оказаться хорошим средством определения количества бактерий в воде, так как грамотрицательные бактерии составляют 80–95 % от прокариотов морской среды [21].

ЛАЛ-тест может быть использован и в электронной промышленности для контроля качества воды. Если в фармацевтической промышленности она может оказаться главным источником пирогенов, то в полупроводниковой промышленности она является источником органического углерода. Результаты определения содержания эндотоксина полученные с помощью кинетического ЛАЛ-теста на приборе ЛАЛ-4 000 показывают хорошую корреляцию с числом бактерий и общим органическим углеродом. Это означает, что ЛАЛ-тест может стать быстрым и чувствительным индикатором уровня загрязнений в воде, используемой в электронной промышленности.

Список литературы

1. *Berman D. et al. // J. Par. Sci. Technol. – 1987. – Vol. 41. – N 5. – P. 158–163.*
2. *Avis K.E. et al. // J. Par. Sci. Technol. – 1987. – N 2. – P. 49–56.*
3. *Кивман Г.Я., Дорохова С.В. // Химю-фарм. журнал – 1984. – Т. 18. – N 6. – С. 737–748.*
4. *Крылов Ю.Ф., Кивман Г.Я. // Биологический контроль безопасности лекарственных средств. – М.: Медицина, 1985.*
5. *Hochstein H.D. // Pharmaceutical Technology. – 1987. – Vol. II. – N 6. – P. 158–163.*
6. *Levin J., Tomasulo P.A., Oser R.S. // J. Lab. Clin. Vtd. – 1970. – Vol. 75. — N 6. — P. 903–911.*
7. *Finegold S.M. et al. // Appl. Microbiol. – 1983. – Vol. 18. – N 3. – P. 458–463.*
8. *Elin R.J., Hosseini J. // Prog. Clin. Biol. Res. – Vol. 189: Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance and detektion with the Limulus amebocyte lysate test. – Alan. R.Liss Inc., N.-Y., 1985. – P. 307–324.*
9. *Pearson F.C. et al. // J. Clin. Microbiol. – 1985. – Vol. 21. – N 6. – P. 865–868.*
10. *No vitsky T.J. // LAL Update. – 1983. – Vol. 1. – N 1. – P. 1.*
11. *Buller H.R. et al. // Prog. Clin. Biol. Res. – Vol. 189: Bacterial endotoxins: Structure, biomedical significance and detection with the Limulus amebocyte lysate test. – Alan. R.Liss Inc., N.-Y., 1985. – P. 865–868.*
12. *Schreibman B. et al. // Curr. Surg. – 1985. – Vol. 42. – N 2. – P. 119–121.*
13. *Nachum R., Shanbron E. // J. Clin. Microbiol. – 1981. – Vol. 13. – N 1. – P. 158–162.*
14. *Nachum R., Lipsey A., Seigel S.F. // New Engl. J. Med. – 1973. – Vol. 289. – N 18. – P. 913–934.*
15. *Jorgensen J.H., Alexander G.A. // J. Clin. Microbiol. – 1982. – Vol. 16. – N 3. – P. 587–589.*
16. *Spagna V.A., Prior R.B., Sawaya G.A. // J. Clin. Microbiol. – 1982. – Vol. 16. – N 1. – P. 77–81.*
17. *Jonsson P. // Nor. Vet.-Med. – 1985. – Vol. 37. – N 5. – P. 298–305.*

18. Svensson A., Hahn-Hagerdal B. // J. Dairy. Res. – 1987. – Vol. 54. – N 2. – P. 267–273.
19. Sonesson A., Larson L., Schutz A., et al. // Appl. environ. Microbiol. – 1990. – Vol. 56. – N 5. – P. 1271–1278.
20. Evans T.M., Schillinger J.E., Stuart D.G. // Appl. Environ. Microbiol. – 1978. – Vol. 35. – P. 376–382.
21. Maeda M., Taga N. // J. Appl. Bacteriol. – 1979. – Vol. 47. – N 1. – P. 175–182.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЛАЛ-тест как официальный метод определения содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах имеет уже более чем 15-летнюю историю. Как научный метод он известен уже четверть века. Большинство стран с развитой фармацевтической промышленностью приняли этот метод и ввели его в свои фармакопеи. Этому не мешает тот факт, что препарат производится всего в нескольких странах, а в большинстве стран, использующих этот тест, ЛАЛ-реагент не производится. В нашей стране перспективы широкого внедрения ЛАЛ-теста сейчас кажутся более оптимистическими чем 5–6 лет назад, когда покупка импортных препаратов за валюту была сложным делом, а кролики в сравнении с заграничным реактивом были, безусловно, намного дешевле. Тогда понятный всем на западе тезис о дешевизне ЛАЛ-теста по сравнению с массовым применение кроликов для нас выглядел несколько натянутым. Сегодня можно сказать, что стоимость проведения ЛАЛ-теста не дороже определения пирогенности на кроликах.

В настоящее время есть утвержденная ВФС, однако полноценное использование теста возможно только после его включения в частные статьи Фармакопеи. Для этого необходимо вначале принять нормы допустимого содержания эндотоксинов в препаратах в зависимости от способа их введения, а затем ввести на основе этих норм допустимые пределы содержания эндотоксинов для конкретных препаратов. Так например, если для парентеральных препаратов будет установлена норма содержания эндотоксина равная 5 э.ед.·кг$^{-1}$·ч$^{-1}$, тогда допустимое содержание эндотоксина в физиологическом растворе можно рассчитать, исходя из общей нормы: доза введения препарата 10 мл·кг$^{-1}$·ч$^{-1}$, следовательно в 1 мл препарата допускается содержание эндотоксина не более 0,5 э.ед. Это действительная норма содержания, установленная в Фармакопее США. В некоторых случаях принимаются специальные

нормы. Так, содержание эндотоксинов в “Воде для инъекций” (USP) не должно превышать 0,25 э.ед./мл, а не 0,5 э.ед./мл, несмотря на такие же как для физиологического раствора объемы введения. Это связано с тем, что вода для инъекций используется для приготовления инъекционных препаратов и содержание эндотоксинов не может быть на верхнем пределе, так как свою долю эндотоксинов могут внести растворяемые в воде субстанции.

Использование опыта ведущих Фармакопей мира – безусловно, правильный путь. Однако и тут есть свои тонкости. Необходимо помнить, что ЛАЛ-тест в США используется уже 15 лет. Все это время происходило постепенное ужесточение норм содержания эндотоксина, идущее параллельно с улучшением качества производства. Таким образом может оказаться, что прямое перенесение норм из Фармакопеи США в условия нашего производства приведет к выбраковке препаратов, которые в тесте на кроликах признаются пригодными. В этом случае желательно предложить ЛАЛ-тест в качестве альтернативного метода, результаты которого могут быть проверены тестом на кроликах с однозначным приоритетом последнего.

Однако введение предельных норм содержания бактериальных эндотоксинов в препаратах, вводимых парентерально, достаточно трудный шаг, требующий экспериментальной проработки. Поэтому проще в каждой частной фармакопейной статье указывать содержание эндотоксина только после проведения серии сопоставительных анализов ЛАЛ и кроликов и определения на основе статистической обработки результатов конкретного значения содержания эндотоксина. В этом случае применение общих норм содержания эндотоксина возможно только после статистической обработки значительного количества данных, включенных в частные фармакопейные статьи. Возможно, в этом случае полученные нормы будут менее жесткими, чем нормы Фармакопеи США.

Стандарт на ЛАЛ-реагент имеет важное значение и связано это с тем, что под общим названием ЛАЛ проходят коммерческие препараты различных фирм производителей. Поэтому в отношении ЛАЛ-реагента разумным был бы подход, разрешающий использование препаратов только тех производителей, которые имеют лицензию на производство препарата в странах, где ЛАЛ-тест давно включен в качестве фармакопейного теста. Такой реагент должен быть зарегистрирован в РФ.

Аналогична этой и проблема стандарта эндотоксина и единицы эндотоксина. Уже отмечалось какое значение имеет стандарт эндотоксина и насколько важно использование стандарта эндотоксина и ЛАЛ-реагента,

поставляемого одной фирмой и проверенных по RSE. Поэтому проблему эндотоксина надо рассматривать вместе с ЛАЛ-реагентом и допускать использование только контрольного стандарта эндотоксина, поставляемого вместе с ЛАЛ реагентом и снабженного сертификатом сравнения его активности по RSE с помощью используемой партии ЛАЛ- реагента.

Что касается методов проведения теста и их модификаций, необходимо, хотя бы на первое время, максимально ограничить возможности их произвольных модификаций. Во всяком случае в отношении проведения фармакопейного анализа, они должны соответствовать методам, указанным поставщиком ЛАЛ реагента. Нельзя произвольно заменять гель-тромб тест на турбидиметрический, если это не оговорено специально производителем, поскольку, как правило, под определенный метод создается свой препарат, и для того чтобы использовать его не по назначению, необходимо иметь большой практический опыт работы с ЛАЛ-тестом. С некоторыми же методами дело обстоит так, что надо сначала покупать прибор, предназначенный для проведения этого метода, а потом уже специальный препарат, который без этого прибора и использовать невозможно.

Есть еще одна сторона использования ЛАЛ-теста, которая упоминалась в обзоре и которая не требует никаких специальных разрешений. Это внутрипроизводственный контроль. Действительно, для проверки качества, например апирогенной воды, в процессе производства не нужно никакого специального разрешения. Анализ прост и результаты его могут оказаться более информативными, чем результаты теста на кроликах, правда официального статуса они не имеют, зато можно прогнозировать результаты производственного процесса, выявить причины и источники загрязнений. Вообще же ЛАЛ-тест может стать весьма полезным средством повышения качества всего производственного процесса вцелом. Целесообразно первые опыты по применению теста ограничить внутрипроизводственным постадийным контролем.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Определение бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста

Ниже приведена процедура подготовки и проведения анализа с помощью ЛАЛ-теста на конкретном примере. Сразу подчеркнем, что будет рассматриваться не полный фармакопейный анализ, а только общие правила проведения с возможными вариантами ответов и объяснением наиболее распространенных ошибок.

Допустим, необходимо убедиться в соответствии качества воды для инъекций норме, установленной в USP (water for ingections), предел содержания эндотоксина в которой равен 0,25 э.ед./мл. Анализ будет проведен с помощью гель-тромб теста как наиболее простого и распространенного.

Необходимые реактивы и оборудование

Оборудование

Для подготовки и проведения теста необходимы пробирки и пипетки, которые могут быть либо пластиковые одноразовые, либо стеклянные для многократного использования.

✓ ***Пробирки для проведения теста.*** Гель-тромб тест проводят в пробирках диаметром 10 мм. Желательно, чтобы эти пробирки были снабжены завинчивающимися алюминиевыми крышками. Это позволяет депирогенизировать их в закрытом виде и предохраняет от попадания эндотоксина из воздуха во время инкубирования. Если крышек нет, пробирки следует закрывать во время инкубирования.

✓ ***Пробирки для приготовления разведений контрольного стандарта эндотоксина и испытуемого препарата.*** Для приготовления разведения

испытуемого препарата и эндотоксина можно использовать пробирки любого диаметра и формы, хотя для этого прекрасно подходят и пробирки диаметром 10 мм, в которых проводится анализ.

✓ ***Пипетки.*** Обычные стеклянные пипетки на 1–5 мл, особых требований к пипеткам не предъявляется.

Подготовка посуды

Тщательно вымытые и высушенные пипетки и пробирки без крышек заворачивают в пергаментную бумагу, кальку или алюминиевую фольгу. Пипетки лучше заворачивать по 5–10 шт. так, чтобы после вскрытия упаковки использовать все сразу. Пробирки, снабженные крышками депирогенизируют закрытыми, при этом их тоже лучше упаковывать группами по 20–30 шт.

Посуду надо депирогенизировать при температуре 180 °С 3 ч или при 200 °С не менее 30 мин. Чем выше температура и чем дольше обработка, тем меньше риска занести эндотоксины.

✓ ***Водяная баня.*** Инкубирование проводится при температуре (37±1) °С. Наиболее предпочтительно использование для инкубирования водяной бани, дающей более равномерный нагрев.

Поддержание температуры в узком интервале во время инкубирования достаточно важно, так как чрезмерный нагрев или недостаточный нагрев могут привести к ошибочным результатам. Возможно использование воздушных термостатов, однако водяная баня более пригодна для проведения теста.

Еще одно обязательное условие – отсутствие колебаний, вибрации, толчков и т. п. во время инкубирования, так как это может привести к необратимому разрушению геля или вообще не дать ему образоваться.

✓ ***Суховоздушный стерилизатор.*** Необходим для подготовки посуды. Термическая депирогенизация – наиболее доступный и надежный способ. Естественно этот способ пригоден только для стеклянной посуды.

✓ ***Мешалка или встряхиватель для перемешивания растворов.***

✓ ***Часы или секундомер.***

ЛАЛ-реактив, контрольный стандарт эндотоксина, вода для ЛАЛ-теста

✓ ***ЛАЛ-реактив.*** Для проведения такого теста надо использовать ЛАЛ-реактив, способный реагировать с эндотоксином в концентрациях, меньших определяемой.

Предположим, что будет использоваться ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,06 э.ед./мл.

Кроме ЛАЛ-реактива необходим контрольный стандарт эндотоксина и вода для ЛАЛ-теста, которая будет использована для приготовления разведений.

Следует помнить, что стандарт эндотоксина и ЛАЛ-реактив – это две части одной реакционной системы, которые не могут быть произвольно выбраны у разных производителей. Они должны быть частью одного набора для определения пирогенности, либо поставлены одним поставщиком или производителем с сопроводительным сертификатом, указывающим, что чувствительность ЛАЛ-реактива может быть определена с помощью этого эндотоксина. В противном случае необходимо будет проводить анализ сравнения активности контрольного стандарта эндотоксина и рабочего стандарта эндотоксина по выбранной партии ЛАЛ-реагента (подробно этот анализ описан в главе 4 "Стандарты эндотоксина").

К выбору воды для ЛАЛ-теста надо относиться очень внимательно. Следует подчеркнуть, что использовать воду для инъекций или "апирогенную воду" нельзя, так как допустимое содержание эндотоксина может быть в несколько раз выше чувствительности ЛАЛ-реактива.

Кроме этого в отдельных случаях могут понадобиться 0,1 Н раствор соляной кислоты, 0,1 Н раствор гидроксида натрия или готовый апирогенный буферный раствор для доведения pH до 6,5–7,5.

Подготовка ЛАЛ реактива, раствора эндотоксина

Лиофилизированный ЛАЛ-реактив разводят установленным объемом воды и аккуратно перемешивают до полного растворения. Обычно для этого требуется несколько минут. Активное встряхивание может привести к пенообразованию и потере чувствительности. Сразу же после разведения препарат помещают в ледяную баню или холодильник. Его можно использовать в течение суток. Препарат можно замораживать и хранить в таком виде 1 месяц. Не допускается повторное замораживание препарата. Разведенный препарат может слегка опалесцировать. При более близком рассмотрении могут быть видны фрагменты клеток. Крупные частицы или желтое окрашивание свидетельствуют о загрязнении и/или денатурации реактива.

Если стандарт эндотоксина лиофильно высушен, его разводят необходимым объемом воды для ЛАЛ-теста и растворяют, встряхивая флакон 30 мин. После этого он готов к использованию. В таком виде

его можно хранить при 2–8 °С не более 4 недель. Замораживание раствора эндотоксина не допускается. Ежедневно перед началом работ раствор эндотоксина активно встряхивают в течение 30 с, затем готовят серию его разведений. Такие серии разведений не хранят, их используют свежеприготовленными.

Это общие правила обращения с ЛАЛ-реактивом и стандартом эндотоксина. В инструкции, прилагаемой фирмой-производителем, должны быть подробно описаны условия разведения и хранения реактивов, которые могут несколько отличаться от приведенных выше.

Предварительные тесты

Прежде чем перейти к описанию процедуры подготовки испытуемого образца и проведения анализа отметим, что кроме собственно анализа конкретной партии препарата на содержание в ней эндотоксина проводятся тесты, в которых проверяется качество ЛАЛ-реагента. Этот сложный анализ проводится для каждой новой партии ЛАЛ-реагента – ***проверка заявленной чувствительности ЛАЛ-реагента.***

Для нового препарата, который еще не испытывался с помощью ЛАЛ-теста или при изменении технологии производства известного препарата проводится тест на ***определение возможности использования ЛАЛ-теста для испытуемого продукта.*** Не останавливаясь подробно на описании, приведем только общую структуру этих анализов.

Проверка заявленной чувствительности ЛАЛ-реагента

При начале работы с новой партией ЛАЛ-реактива необходимо удостовериться в соответствии его чувствительности той, что указана на этикетке. Для этого готовят серию двукратных последовательных разведений контрольного стандартного эндотоксина. Обычно для анализа используют серию из 4 разведений эндотоксина с концентрацией, близкой к заявленной чувствительности ЛАЛ-реагента. Например, серию следующих концентраций: 2λ, λ, $0{,}5\lambda$, и $0{,}25\lambda$ (λ – чувствительность лизата). Анализ проводят в четырех повторностях для каждого разведения. Одновременно ставится отрицательный контроль. По результатам теста определяют реальную чувствительность данной партии ЛАЛ-реагента. Геометрическое среднее значение чувствительности ЛАЛ-реагента (x) должно находиться в диапазоне $0{,}5\lambda \leq x \leq 2\lambda$.

Определение возможности использования ЛАЛ-теста для испытуемого продукта

Это предварительный анализ, который проводится для выяснения возможности использования ЛАЛ-теста для конкретного препарата, т.е. для того, чтобы убедиться в отсутствии ингибирования реакции ЛАЛ-реагента с эндотоксином, а также в том, что препарат не вызывает гелирования ЛАЛ-реагента. В этом тесте проверяют испытуемый препарат в разных разведениях с добавлением и без добавления эндотоксина в разных концентрациях. Анализ проводится для нескольких промышленных партий испытуемого препарата. Анализируют не менее 3 образцов каждой партии в начале, середине и конце производства. Каждый образец проверяется в 2 повторностях. Препарат считается прошедшим тест, если не показано ингибирование: т.е. определенная в тесте известная концентрация эндотоксина, добавленного испытуемому препарату находится в пределах допустимой ошибки опыта. А в пробах без добавления эндотоксина реакция отрицательная, т.е. препарат не вызывает гелирования ЛАЛ-реагента. Если эндотоксины обнаруживаются в образце, в который не был добавлен стандартный эндотоксин, можно предположить, что гелирование вызвано эндотоксинами, присутствующими в испытуемом препарате. В этом случае их необходимо удалить, например ультрафильтрацией, и затем повторить тест.

Если результаты указывают на ингибирование и/или усиление реакции между ЛАЛ-реагентом и эндотоксином, препарат нельзя проверять с помощью ЛАЛ-теста. Тест может быть повторен в том случае, если условия, мешающие проведению анализа, могут быть устранены каким-либо способом.

Еще один тест, который должен проводиться ежедневно – ***проверка чувствительности ЛАЛ-реагента.*** Смысл анализа – в проверке пригодности ЛАЛ-реактива для анализа, с его помощью можно обнаружить снижение или потерю чувствительности ЛАЛ-реагента во время хранения. В тесте используют серию двукратных разведений стандарта эндотоксина, перекрывающую чувствительность ЛАЛ-реактива (λ), например серию с концентрациями эндотоксина 2λ, λ, $0,5\lambda$ и $0,25\lambda$. Пробы проверяют в одной повторности. Чувствительность считается подтвержденной, если твердый гель образуется, по крайней мере, в одном разведении в диапазоне $0,5–2\lambda$, а в разведении $0,25\lambda$ геля не образуется. Подчеркнем, что этот анализ проводится для ЛАЛ-реактива с уже подтвержденной заявленной чувствительностью.

Процедура анализа

✓ Вычисление максимально допустимой концентрации эндотоксинов и максимально допустимой степени разведения испытуемого препарата.

✓ Определение максимально допустимой концентрации эндотоксинов.

Максимально допустимая концентрация эндотоксина в испытуемом препарате такая, при введении которой у пациента не возникает пирогенной реакции. Эта норма содержания эндотоксина зависит от дозы введения препарата и способа его введения. Как правило, это значение указывается в частной фармакопейной статье. Так как дозы введения препарата различны, допустимая концентрация эндотоксина в препарате также сильно варьирует от пугающе больших до очень низких значений.

Например:

Препарат	Максимально допустимая концентрация эндотоксина	Доза введения препарата на кг массы в час
Метилэргоновина малеат	1666,67 э.ед./мг	0,003 мг
Скополамина гидробромид	555,56 э.ед./мг	0,009 мг
Магния сульфат	0,088 э.ед./мг	57,1 мг
Хлорид натрия 0,45-0,9 %	0,5 э.ед./мл	10,0 мл

В том случае, если в фармакопейной статье не указана максимально допустимая концентрация эндотоксина, она может быть вычислена с использованием значения допустимой нормы введения эндотоксина.

Допустимая норма введения эндотоксина должна быть приведена в Фармакопее и указывать на то, сколько единиц эндотоксина можно вводить пациенту на 1 кг массы в час. Значение этой нормы зависит от способа введения препарата. Так, в Американской Фармакопее установлено, что для внутривенного введения допустимо введение 5 единиц эндотоксина на килограмм массы в час. Для лекарств, вводимых в оболочку спинного мозга и для внутриполостного (в головной мозг/оболочку головного мозга) введения, допустимая норма введения эндотоксина составляет 0,2 единицы эндотоксина на килограмм массы в час.

Таким образом, если для препарата значение допустимой концентрации эндотоксина не установлено в частной статье, оно может быть определенно по формуле:

$$\text{Максимально допустимая концентрация эндотоксина} = \frac{K}{M},$$

где К – допустимая норма введения эндотоксина, указанная в Фармакопее; М – доза препарата, вводимая в течение одного часа на килограмм массы. Это может быть доза введения лекарства, установленная для человека, либо доза, водимая кроликам. Если значения имеются для обеих доз, всегда используется большее значение.

В качестве иллюстрации можно привести расчеты с использованием значения доз введения вышеприведенных препаратов. Все они вводятся внутривенно, следовательно К = 5 э.ед.·кг$^{-1}$·ч$^{-1}$.

Препарат	Доза введения препарата на кг массы в час	$\frac{K}{M}$	Максимально допустимая концентрация эндотоксина
Метилэргоновина малеат	0,003 мг·кг$^{-1}$·ч$^{-1}$	$\frac{5\ \text{э.ед.}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}}{0{,}003\ \text{мг}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}}$	1666,66 э.ед./мг
Скополамина гидробромид	0,009 мг·кг$^{-1}$·ч$^{-1}$	$\frac{5\ \text{э.ед.}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}}{0{,}009\ \text{мг}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}}$	555,55 э.ед./мг
Магния сульфат	57,1 мг·кг$^{-1}$·ч$^{-1}$	$\frac{5\ \text{э.ед.}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}}{57{,}1\ \text{мг}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}}$	0,0875 э.ед./мг
Хлорид натрия 0,45-0,9 %	10 мг·кг$^{-1}$·ч$^{-1}$	$\frac{5\ \text{э.ед.}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}}{10\ \text{мг}\cdot\text{кг}^{-1}\cdot\text{ч}^{-1}}$	0,5 э.ед./мл

Если норма введения препарата человеку не установлена, используют норму введения, установленную для анализа пирогенности на кроликах. Например, для расчета концентрации эндотоксина в хлориде натрия использовалась доза введения препарата, установленная для кроликов (10 мл·кг$^{-1}$·ч$^{-1}$).

В некоторых случаях в частной статье может указываться допустимая концентрация эндотоксина, отличная от расчетной; например, в USP установлена норма содержания эндотоксина в воде для инъекций, равная 0,25 э.ед./мл, а не 0,5 э.ед./мл, как это следовало бы из выше приведенного примера.

Определение максимально допустимой степени разведения продукта

Как правило для проведения теста используют не исходный препарат, а его разведения. Этому есть несколько объяснений.

1. Высокая чувствительность ЛАЛ-реагента позволяет определять методом гель-тромб тест концентрацию эндотоксина, равную

0,03–0,06 э.ед./мл, что, как правило, значительно ниже допустимой концентрации эндотоксина (для большинства препаратов эта концентрация находится в пределах 0,1–100 э.ед./мл).

2. В случае ингибирования или усиления реакции разведение препарата является самым простым способом устранения этих нежелательных явлений.

3. С помощью серии разведений можно получить не только ответ типа Да/Нет, но и достаточно точно оценить концентрацию эндотоксина.

Однако при приготовлении разведений необходимо помнить, что в какой-то момент будет достигнута такая степень разведения, после которой получение результатов теряет смысл. Это напрямую зависит от чувствительности ЛАЛ-реагента и допустимой концентрации эндотоксина. Теоретически любую концентрацию эндотоксина можно последовательным разбавлением довести до такого уровня, при котором самый чувствительный ЛАЛ-реагент даст отрицательный результат. Используя значение последнего разведения, давшего положительный результат, и чувствительность ЛАЛ-реактива, можно будет определить исходную концентрацию эндотоксина. Однако это скорее научно-исследовательская задача, а не фармакопейный анализ, который предполагает получение ответа – соответствует концентрация эндотоксина норме или нет.

Пояснить сказанное можно следующим образом: если при анализе серии разведений испытуемого препарата с помощью ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,5 э.ед./мл последние положительные результаты были получены в разведении 1:8, это означает, что концентрация эндотоксина составляет 4 э.ед./мл. Возможно это полезная информация, однако, если для этого препарата установлен предел концентрации эндотоксина, равный 1 э.ед./мл, этот результат не представляет никакой ценности для анализа разрешающего или запрещающего использование препарата и тратить время на получение такого ответа бессмысленно.

Поэтому перед проведением анализа рассчитывают максимально допустимую степень разведения для этого конкретного препарата и конкретного ЛАЛ-реагента (Maximum Valid Dilution). Так как реальное содержание эндотоксина в испытуемом препарате неизвестно, предполагается, что оно меньше или равно установленной Фармакопеей норме. Зная эту норму и чувствительность ЛАЛ-реактива, можно определить ту последнюю степень разведения, при которой результаты будут иметь ценность.

Расчет максимально допустимой степени разведения может быть произведен различными способами, проще всего это сделать, если уже

известна максимально допустимая концентрация эндотоксина в препарате. В этом случае максимально допустимая степень разведения (Р) будет равна:

$$P = \frac{\text{максимально допустимая концентрация эндотоксина}}{\lambda\ \text{(чувствительность ЛАЛ-реактива)}}.$$

Если допустимая концентрация эндотоксина определена в мг или ЕД испытуемого препарата для расчета значения максимально допустимой степени разведения, необходимо знать какова концентрация активного вещества при введении.

Подготовка разведений испытуемого продукта

В нашем конкретном анализе степень разведения испытуемого продукта (т.е. воды для инъекций) будет равна:

$$P = \frac{0{,}25\ \text{э.ед./мл}}{0{,}06\ \text{э.ед./мл}} = 4\,.$$

Таким образом, максимальная степень разведения испытуемого образца должна быть равна 1:4. Необходимо подготовить серию последовательных двукратных разведений испытуемого продукта 1:2; 1:4. Эти разведения готовятся с использованием воды для ЛАЛ-теста. Для этого можно взять 0,5 мл исходного препарата и в пробирке смешать с 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста. Затем от полученного раствора отобрать 0,5 мл и смешать с 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста, так же, если необходимо, готовятся и следующие разведения. Таким образом мы получаем две пробирки – в первой содержится 0,5 мл разведения 1:2, а во второй – 1 мл разведения 1:4. Учитывая, что в каждой пробе испытываются по 0,1 мл испытуемого разведения и каждое разведение испытывается в двух повторностях, объема 0,5 мл вполне достаточно. При приготовлении разведения надо учитывать точность отбора пробы пипеткой. В случае сомнения относительно этого лучше использовать большие объемы, чтобы избежать ошибки на стадии приготовления разведений. Полученные растворы следует тщательно перемешивать. Для отбора каждой следующей пробы надо использовать отдельную пипетку.

В данном случае в анализе будут использованы оба эти разведения и исходный препарат. При количественном определении содержания

эндотоксина корректные результаты могут быть получены и с использованием всего 2 разведений, правда при условии, что в одном разведении обе пробы будут отрицательны, а в другом – обе положительны. На практике большинство препаратов необходимо разводить в сто и более раз. При этом угадать примерную степень разведения практически невозможно. В этом случае целесообразно сначала грубо определить концентрацию, например с использованием нескольких десятикратных разведений, а затем перейти к двукратным разведения в выбранном диапазоне.

Контроль

Для проверки достоверности результатов опыта ставится контроль отрицательный и положительный.

✓ ***Отрицательный контроль*** – представляет собой смесь ЛАЛ-реактива и воду для ЛАЛ-теста.

✓ ***Положительный контроль*** – ЛАЛ-реактив и испытуемый препарат в выбранных разведениях, к каждому из которых добавлен эндотоксин в концентрации 2λ. Проба готовится так же, как и разведение с водой, но последнее разведение осуществляют не водой, а раствором эндотоксина в концентрации 4λ. Так, для получения разведения 1:2 для положительного контроля необходимо развести исходный препарат равным объемом раствора эндотоксина с концентрацией 4λ. Для разведения 1:4 – к разведению 1:2, приготовленном на воде, добавляют равный объем раствора эндотоксина в концентрации 4λ и т. д. Так получаются разведения, в которых эндотоксин присутствует в концентрации, которая гарантирует образование геля. Принято использовать концентрацию вдвое большую чувствительности ЛАЛ-реактива (λ). В данном случае она должна быть равна 0,125 э.ед./мл.

Постановка теста

Из всего изложенного следует, что для постановки опыта необходимы три пробирки с испытуемым продуктом в разных концентрациях (1; 1:2; 1:4); столько же пробирок с испытуемым продуктом в тех же разведениях, к которым добавлен эндотоксин в концентрации 2λ (0,125 э.ед./мл) и флакон с водой для разведения ЛАЛ-реактива, которая будет использоваться в качестве отрицательного контроля. Каждая проба проверяется в 2 повторностях. Следовательно

необходимо 14 пробирок диаметром 10 мм, в которых будет проводиться анализ. Эти пробирки следует сразу подписать, указав степень разведения или концентрацию эндотоксина. Их лучше располагать парами, но в любом случае они должны находиться на одном штативе.

В пробирку переносится 0,1 мл одного из испытуемых растворов. Для каждого из испытуемых растворов необходимо использовать свою пипетку. После того как все пробирки будут заполнены, можно вносить ЛАЛ-реактив. В каждую пробирку добавляют по 0,1 мл ЛАЛ-реактива. Добавление ЛАЛ-реактива должно быть выполнено по возможности быстро. Получившуюся реакционную смесь (0,2 мл) надо аккуратно перемешать, поворачивая пробирку. Нельзя интенсивно встряхивать реакционную смесь.

Пробирки с реакционной смесью должны быть закрыты. Штатив с пробирками помещают в водяную баню, уровень воды должен быть таким, чтобы пробирки были покрыты примерно на 1/3. Пробирки не должны всплывать. Уже отмечалось, что реакция между ЛАЛ-реактивом и эндотоксином зависит от температуры и времени реакции. Точное поддержание оптимальной температуры (37±1) °С необходимо при использовании любого метода проведения теста. Уменьшение температуры до 25 °С приводит к замедлению скорости реакции, повышение до 45 °С – к разрушению белков ЛАЛ-реактива. Исключительно важное значение имеет строгое соблюдение времени инкубирования. Для гель-тромб теста оно составляет (60±2) мин. Точно через 60 мин инкубирования пробирку вынимают из штатива. Нельзя вынимать штатив со всеми пробирками, нельзя ударять или встряхивать пробирки. Пробирки медленно и аккуратно переворачивают на 180°.

Наличие твердого геля на дне пробирки, не разрушающегося при переворачивании ее на 180°, называется положительной реакцией (обозначается +) и означает, что концентрация эндотоксина в ней больше или равна чувствительности ЛАЛ-реактива.

Отсутствие твердого геля или разрушение геля при переворачивании пробирки называется отрицательной реакцией (обозначается -), это означает, что концентрация эндотоксина несколько или значительно ниже чувствительности ЛАЛ-реактива.

Надо помнить, что гель очень хрупок и неосторожное обращение с пробирками (удары, встряхивание) при оценке результатов может вызвать разрушение геля.

Результаты и их интерпретация

Результаты теста могут быть воспроизведены по следующей схеме:

Повторность	Разведение испытуемого продукта			Контроль положительный (в каждом разведении конц. эндотоксина 0,125 э.ед/мл)			Контроль отрицательный (ЛАЛ + вода для ЛАЛ)
	1	1:2	1:4	1	1:2	1:4	
1							
2							

Рассмотрим теперь возможные комбинации результатов.

Общее правило: сначала оценивается корректность контроля, потом собственно результаты теста.

Пример 1

Повторность	Разведение испытуемого продукта			Контроль положительный (в каждом разведении конц. эндотоксина 0,125 э.ед/мл)			Контроль отрицательный (ЛАЛ + вода для ЛАЛ)
	1	1:2	1:4	1	1:2	1:4	
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-

Отрицательные результаты для положительного контроля могут свидетельствовать о следующем:

а) нарушении правил инкубирования: например, слишком высокая температура, возможно кратковременное повышение, менее вероятны слишком низкая температура и неравномерный нагрев;

б) вибрация во время инкубирования: например, включенная мешалка для принудительной циркуляции воды в бане, вибрация, передаваемая из других источников (холодильника, вентилятора и др.);

в) недостаточное разведение испытуемого препарата и особенно эндотоксина, что возможно при слабом и непродолжительном перемешивании (лучше 1 мин интенсивного встряхивания без разбрызгивания);

г) некачественный ЛАЛ-реактив: вышел срок хранения препарата, хранился в условиях, не соответствующих требованиям и т.д. Впрочем, это должно быть обнаружено при проведении ежедневного теста проверки чувствительности ЛАЛ-реактива.

Пример 2

Повтор-ность	Разведение испытуемого продукта			Контроль положительный (в каждом разведении конц. эндотоксина 0,125 э.ед/мл)			Контроль отрицательный (ЛАЛ + вода для ЛАЛ)
	1	1:2	1:4	1	1:2	1:4	
1	+	+	-	+	+	+	+
2	+	-	-	+	+	+	+

Положительные результаты в положительном контроле говорят о корректном выполнении всех вышеперечисленных требований. Но положительный результат в отрицательном контроле перечеркивает результаты теста. В этом случае рассматривать результаты, полученные для испытуемого препарата вообще не имеет смысла, а причиной неудачи является внесение эндотоксина в процессе проведения теста, т.е. :

а) использование неапирогенных пипеток, пробирок, что приводит к дополнительному внесению эндотоксинов в реакционную смесь. Соблюдение всех условий депирогенизации тем важнее, чем выше чувствительность ЛАЛ-реактива. (Вообще к пипеткам даже к стеклянным нужно относиться как к одноразовым в буквальном смысле слова, использовать только раз для отбора пробы или воды);

б) возможно попадание эндотоксина из воздуха в незакрытые флаконы;

в) использование "грязной" воды для разведения ЛАЛ-реактива, в этом случае подобные результаты будут повторяться, а если этой водой разводили ЛАЛ-реактив, возможно, единственным выходом будет использование нового флакона ЛАЛ-реактива.

Пример 3

Повтор-ность	Разведение испытуемого продукта			Контроль положительный (в каждом разведении конц. эндотоксина 0,125 э.ед/мл)			Контроль отрицательный (ЛАЛ + вода для ЛАЛ)
	1	1:2	1:4	1	1:2	1:4	
1	+	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+	-

Корректно проведенный положительный и отрицательной контроль позволяют обратиться к результатам проверки испытуемого продукта,

однако, сами эти результаты говорят о превышении содержания эндотоксина по сравнению с допустимым значением: 0,06×4 = 0,25 э.ед./мл.

Дальнейшее разведение и проверка имеют смысл только в случае, если необходимо узнать в какой же все-таки концентрации присутствует эндотоксин в испытуемом растворе.

Пример 4

Повторность	Разведение испытуемого продукта			Контроль положительный (в каждом разведении конц. эндотоксина 0,125 э.ед/мл)			Контроль отрицательный (ЛАЛ + вода для ЛАЛ)
	1	1:2	1:4	1	1:2	1:4	
1	-	+	+	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	+	-

Результаты теста нельзя использовать для расчетов, так как для расчета концентрации эндотоксина используется значение последнего разведения, давшего твердый гель в каждой из повторностей. Скорее всего причиной является эпизодическое нарушение какого-либо из перечисленных выше условий; чистота пипеток, пробирок, отсутствие крышек, недостаточно полное перемешивание.

Пример 5

Повторность	Разведение испытуемого продукта			Контроль положительный (в каждом разведении конц. эндотоксина 0,125 э.ед/мл)			Контроль отрицательный (ЛАЛ + вода для ЛАЛ)
	1	1:2	1:4	1	1:2	1:4	
1	-	-	-	+	+	+	-
2	-	-	-	+	+	+	-

Пример 6

Повторность	Разведение испытуемого продукта			Контроль положительный (в каждом разведении конц. эндотоксина 0,125 э.ед/мл)			Контроль отрицательный (ЛАЛ + вода для ЛАЛ)
	1	1:2	1:4	1	1:2	1:4	
1	+	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	+	+	+	-

Пример 7

Повторность	Разведение испытуемого продукта			Контроль положительный (в каждом разведении конц. эндотоксина 0,125 э.ед/мл)			Контроль отрицательный (ЛАЛ + вода для ЛАЛ)
	1	1:2	1:4	1	1:2	1:4	
1	+	+	-	+	+	+	-
2	+	+	-	+	+	+	-

Пример 8

Повторность	Разведение испытуемого продукта			Контроль положительный (в каждом разведении конц. эндотоксина 0,125 э.ед/мл)			Контроль отрицательный (ЛАЛ + вода для ЛАЛ)
	1	1:2	1:4	1	1:2	1:4	
1	+	+	-	+	+	+	-
2	+	-	-	+	+	+	-

В примерах 5–8 результаты удовлетворительные и можно оценить концентрацию эндотоксина в испытуемом препарате.

В том случае, если в двух повторностях образовался твердый гель, а в следующих двух геля нет, за результат принимается значение концентрации эндотоксина, полученное для разведения, давшего твердый гель ($\lambda \times P$, где λ – чувствительность ЛАЛ-реактива, P – степень разведения испытуемого препарата).

В примере 5 твердый гель не получен ни для одной пробы, это означает, что установить значение концентрации в данном анализе с данным ЛАЛ-реактивом невозможно, а можно только утверждать, что оно меньше предела определения этого ЛАЛ-реактива.

0,06 э.ед./мл×1 = 0,06 э.ед./мл – в этом случае концентрация эндотоксина устанавливается, как < 0,06 э.ед./мл.

В примере 6 твердый гель получен для исходного препарата, следовательно концентрация эндотоксина в испытуемом препарате равна

0,06 э.ед./мл×1 = 0,06 э.ед./мл.

В примере 7 твердый гель получен для разведения 1:2, следовательно концентрация эндотоксина в испытуемом препарате равна

0,06 э.ед./мл×2 = 0,125 э.ед./мл.

В примере 8 положительные результаты получены для разных разведений, поэтому для установления концентрации эндотоксина необходимо рассчитать среднее значение. Так как в серии разведения продукта концентрация увеличивается не арифметически, а геометрически, значение концентрации эндотоксина вычисляется как среднее геометрическое значение по формуле:

среднее геометрическое значение = antilog $\Sigma e/f = 10\Sigma^{e/f}$,

где Σe – сумма логарифмов значений концентрации эндотоксина для разведения, в котором получен твердый гель; f – количество конечных точек для которых получен твердый гель.

Повторность 1. 0,06 э.ед./мл×1 = 0,125 э.ед./мл.
Повторность 2. 0,06 э.ед./мл×2 = 0,06 э.ед./мл.

Геометрическое среднее значение:

Se = $\log_{10}(0{,}125) + \log_{10}(0{,}06) = -2{,}12494$
Se/f =-2,12494/2 = -1,06247
antilog Se/f = $10^{-1{,}06247}$ = 0,87 э.ед./мл.

Концентрация эндотоксина в примере 8 равна 0,87 э.ед./мл.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Список фирм-производителей ЛАЛ реактива, чьи препараты официально разрешены к использованию ФДА США.

PYROTEL
Fssociates of Cape Cod Inc/
Woods Hole M.A.

LIMUSATE
Haemochem Inc.
St. Louis. MO

LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE
M.A. Bioproducts.-Division of dynascences corp.
Walkerswille MO.

PYROGENT
Mallincrodt Inc.
St.Louis. Mo.

LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE
Travenol Laboratiries Inc.
Glendale Ca.

LIMUDASE
Marine Biologicals Inc.
Marmora. NJ.